

Aus der Fachrichtung Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
Abteilung für Allgemeine und Klinische Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Veit Flockerzi

**Expression, calciumfluorimetrische und elektrophysiologische  
Untersuchung von TRPC6 in chromaffinen Nebennierenzellen  
von Mäusen**



Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der  
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von Bastian Raphael Büttner  
geb. 19.07.1983 in Kassel

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Matthias Bödding

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungen und Symbole

<b>1.1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Nebenniere</b>	<b>7</b>
2.1.1	Allgemeines	7
2.1.2	Vegetatives Nervensystem	8
2.1.3	Nebennierenmark	10
<b>2.2</b>	<b>Signaltransduktion zwischen Zellen</b>	<b>11</b>
2.2.1	Allgemeines	11
2.2.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Signaltransduktionskaskaden	11
2.2.3	Calcium	12
2.2.4	Calcium-Signale	13
2.2.5	Calcium-Signale in Nervenendigungen	15
2.2.6	Calcium-Signale in chromaffinen Nebennierenmarkzellen	15
<b>2.3</b>	<b>TRP-Kanäle</b>	<b>16</b>
2.3.1	Familie der TRP-Kanäle	16
2.3.2	Struktur der TRP-Kanäle	18
2.3.3	Funktionelle Eigenschaften der TRP-Kanäle	19
2.3.4	TRPC3/6/7-Subfamilie	20
2.3.5	TRPC6	20
2.3.5.1	Genetik	20
2.3.5.2	Struktur	21
2.3.5.3	Elektrophysiologische Eigenschaften	22
2.3.5.4	Aktivierung und Regulation	22
2.3.5.5	Pharmakologie	24
2.3.5.6	Expression	24
2.3.5.7	Physiologie und Pathophysiologie	25
<b>2.4</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>27</b>

<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>28</b>
3.1.1	Verbrauchsmaterialien	28
3.1.2	Reagenzien und Enzyme	29
3.1.3	Agonisten	30
3.1.4	Primer und Antikörper	30
3.1.5	Lösungen	30
3.1.6	Zellen	32
3.1.7	Tiere	33
3.1.8	Geräte	33
3.1.9	Computerprogramme	34
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
3.2.1	Kultivierung von HEK293-Zellen	35
3.2.2	Präparation von chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen	35
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion	37
3.2.4	Western Blot	39
3.2.5	Calcium-Imaging	42
3.2.6	Elektrophysiologie	45
3.2.7	Auswertung und Statistik	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Nachweis von TRPC6-mRNA und TRPC6-Proteinen in chromaffinen Nebennierenzellen der Maus</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Calcium-Imaging</b>	<b>51</b>
4.2.1	Calciumfluorimetrische Untersuchung von HEK 293-Zellen	51
4.2.2	Calciumfluorimetrische Untersuchung von chromaffinen Nebennierenzellen	54
<b>4.3</b>	<b>Patch-Clamp-Untersuchungen</b>	<b>57</b>
4.3.1	Ionenströme TRPC6 überexprimierender HEK 293-Zellen	57
4.3.2	Wirkung von Hyperforin auf TRPC6 überexprimierende und untransfizierte HEK 293-Zellen	61
4.3.3	Wirkung von 1-Oleyl-2-acetyl-sn-glycerol und Carbachol auf Ionenströme chromaffiner Nebennierenzellen	65

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	74
<b>5.1</b>	<b>Calcium-Imaging</b>	74
5.1.1	HEK 293-Zellen	74
5.1.2	Chromaffine Nebennierenzellen	75
<b>5.2</b>	<b>Patch-Clamp-Untersuchungen</b>	78
5.2.1	TRPC6 stabil überexprimierende HEK 293-Zellen	78
5.2.2	Messungen mit Hyperforin	79
5.2.3	Chromaffine Nebennierenzellen	81
5.2.4	Ausblick	84
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	85
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	102
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	103

## Abkürzungen und Symbole:

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
A/D-Wandler	Analog-/Digitalwandler
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
A.U.	Arbitrary units (arbiträre Einheiten)
A-Zellen	Adrenalin produzierende chromaffine Nebennierenmarkzellen
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure)
BSA	Bovine Serum Albumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C6neg	TRPC6-defizient
Ca <sup>++</sup>	Calcium
[Ca <sup>++</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre freie Calciumionenkonzentration
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cch.	Carbachol
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
CIRPIB	Calcium-/Calmodulin- /IP <sub>3</sub> -Receptor-Phosphatidylinositol-Bindungs-Domäne
C-Lösung	Kollagenase-Lösung
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CsCl	Cäsiumchlorid
CsOH	Cäsiumhydroxid
DAG	Diacylglycerol
D/A-Wandler	Digital-/Analog-Wandler
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat-haltiges Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dTRP	Drosophila melanogaster Transient Receptor Potential-Protein
DTT	Dithiothreitol

ECL	Enhanced Chemoluminescence
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-tetraacetic acid (Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-tetraessigsäure)
et al.	Et alii; lateinisch für und andere
F <sub>340</sub> / F <sub>380</sub>	Fluoreszenz bei 340 / 380 Nanometern
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon
FKS	Fetales Kälber-Serum
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethylester
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GFP	Green Fluorescent Protein
G-Protein	Guanylnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Human
HEK 293-Zellen	Human Embryonic Kidney-Zellen der Linie 293
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
Hyp.	Hyperforin
I	Strom
I/V-Kurve	Strom-Spannungs-Kurve
I <sub>CRAC</sub>	Calcium-release activated Calcium current
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> -Rezeptor
I <sub>peak</sub>	Spitzenstrom
ITS-X	Insulin-Transferrin-Selenium-X-Supplement
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
m	Murin
mAChR	muskarinerge Acetylcholinrezeptor
μg	Mikrogramm
Mg <sup>++</sup>	Magnesium
MgATP	Magnesium-Adenosin-5'-triphosphat
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimol
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid

ms	Millisekunde
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
n	Probenzahl
N.	Nervus
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
noCa	Calciumfrei
N-Zellen	Noradrenalin produzierende chromaffine Nebennierenmarkzellen
o.g.	oben genannt
OAG	1-Oleyl-2-acetyl-sn-glycerol
ORAI	CRAC-Calcium-release activated
p	P-Wert
pA	Picoampère
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
Pen / Strep	Penicillin / Streptomycin
pF	Picofarad
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
P-Lösung	Papain-Lösung
pS	Picosiemens
RNA	Ribonucleic Acid
ROCC	Receptor-operated calcium channels
ROI	Region Of Interest
rpm	rounds per minute, englisch für Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RyR	Ryanodinrezeptor
s	Sekunde
s.	Siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
se	stabil überexprimierend
SEM	Standardfehler des Mittelwertes



SOCE	Store-operated calcium entry
STIM	Stromal Interaction Molecule
s.u.	siehe unten
TBE-Puffer	TRIS-Borat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	TRP-Protein vom Ankyrin-Typ
TRPC	TRP-Protein vom kanonischen / klassischen Typ
TRPM	TRP-Protein vom Melastatin-Typ
TRPML	TRP-Protein vom Mucolipin-Typ
TRPN	TRP-Protein vom NO-Mechano-Potential-C-Kanal-Typ
TRPP	TRP-Protein vom Polyzystin-Typ
TRPV	TRP-Protein vom Vanilloid-Typ
t-SNARE	Target soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor
tt	transient transfiziert
u.a.	unter anderem
V	Volt
V.	Vena
VOCC	Voltage-operated calcium channels
v-SNARE	Vesicula soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor
WT	Wildtyp
WTP	Western-Transfer-Puffer
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
*	signifikanter Unterschied; $p < 0,05$
**	signifikanter Unterschied; $p < 0,01$
***	signifikanter Unterschied; $p < 0,001$
° C	Grad Celsius
$\Omega$	Ohm

## 1.1 Zusammenfassung

Ein Anstieg in der intrazellulären freien Calciumionen-Konzentration ( $[Ca^{++}]_i$ ) führt zu einer Freisetzung von Katecholaminen aus chromaffinen Nebennierenzellen in das Blut. Die Beteiligung spannungsabhängiger Calciumionenkanäle an der Katecholaminsekretion wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Welche weiteren Ionenkanäle in chromaffinen Nebennierenzellen bei der Freisetzung von Katecholaminen eine Rolle spielen, ist jedoch noch größtenteils unbekannt. Die in meiner Arbeit dargestellten Experimente wurden an chromaffinen Nebennierenzellen durchgeführt, um eine Beteiligung von *Transient Receptor Potential Canonical-Ionenkanälen Typ 6* (TRPC6) an der Calcium-Signalgebung chromaffiner Nebennierenzellen zu untersuchen. Chromaffine Nebennierenzellen sind zudem ein etabliertes Modell für neuronale Zellen, an dem die Katecholaminsekretion und die beteiligten Signaltransduktionskaskaden gut untersucht werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in chromaffinen Nebennierenzellen der Maus die Transkription und Expression von TRPC6 mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Western Blot nachgewiesen werden. Der TRPC6-Ionenkanal ist ein calciumpermeabler Kationenkanal, der durch 1-Oleyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG), ein membrangängiges Analogon des Second messenger-Botenstoffes Diacylglycerol aktiviert werden kann. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die erstmalige funktionelle Charakterisierung von TRPC6 in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen, um so ein besseres Verständnis der Regulation physiologischer und pathophysiologischer Stressreaktionen zu erhalten.

Zur funktionellen Charakterisierung von TRPC6 in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen wurden Calcium-Imaging-Versuche durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten Messungen an TRPC6 exprimierenden *Human Embryonic Kidney*-Zellen (HEK 293). 100 Sekunden nach Beginn der Messung erfolgte die Applikation von 100  $\mu$ M OAG. Für diese Konzentration wurde eine deutliche Aktivierung von TRPC6-Kanälen beschrieben (Hofmann et al., 1999). 800 Sekunden nach Messbeginn wurde 500  $\mu$ M Carbachol appliziert, mit dem Ziel, die Vitalität der untersuchten Zellen zu überprüfen. Sowohl HEK 293-Zellen, als auch chromaffine Nebennierenzellen exprimieren muskarinerge Acetylcholinrezeptoren, welche u.a. mittels Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) eine Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Reticulum bewirken (Atwood et al., 2011; Huppelsberg und Walter, 2005; Garcia et al., 2006). Zudem sollte eine indirekte Aktivierung von TRPC6 untersucht werden. Die Stimulation von muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren mit der nachfolgenden Produktion von Diacylglycerol stellt einen möglichen physiologischen Aktivierungsweg von TRPC6, sowie einen physiologischen Aktivierungsweg von chromaffinen Nebennierenzellen dar (Huppelsberg und Walter, 2005). OAG induzierte einen signifikanten

Calciumionen-Einstrom in TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen. Muskarinerge Stimulation mittels Carbachol führte zu einer sofortigen Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$ , wobei diese hauptsächlich durch eine Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern vermittelt wurde. In calciumfluorimetrischen Untersuchungen chromaffiner Nebennierenzellen in calciumhaltiger Badlösung zeigte sich eine oszillierende Zunahme der Fluoreszenz-Ratio nach Applikation von OAG als Zeichen einer Erhöhung der  $[Ca^{++}]_i$ . In calciumfreier Badlösung konnte im Gegensatz zu den o.g. Versuchen so gut wie keine Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass die OAG- und Carbachol-vermittelte Calciumionen-Konzentrationserhöhung in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen zum Großteil abhängig ist von extrazellulärem Calcium (Calcium-Einstrom; Calcium induced Calcium release).

Kurz vor Beginn meiner Experimente wurde Hyperforin, ein Hauptwirkstoff des Johanniskrauts, als selektiver Agonist von TRPC6 beschrieben (Leuner et al., 2007). Damit erschien eine Differenzierung durch OAG ausgelöster Ströme in TRPC6- und TRPC3-/7-Stromanteile möglich. In whole cell Patch Clamp-Untersuchungen an stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen wurde eine deutliche Stromzunahme bei Applikation von Hyperforin gemessen. Der induzierte Strom zeigte eine annähernd lineare Spannungsabhängigkeit und wies ein Umkehrpotential von etwa -10 mV auf. In calciumfreier Badlösung fehlte die Einstrom-Komponente fast vollständig. Zudem verschob sich das Umkehrpotential in negativere Bereiche. Die Stromzunahme konnte in gleicher Weise auch bei untransfizierten HEK 293-Zellen in calciumhaltiger oder calciumfreier Badlösung nachgewiesen werden, fiel hier jedoch nur halb so groß aus. Die Art des Stromes unterschied sich damit stark von den Strömen, welche bei Applikation von OAG bzw. Carbachol gemessen werden konnten (s.u.). Eine spezifische und alleinige Aktivierung von TRPC6 durch Hyperforin konnte somit nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund erfolgten keine weiteren Messungen mit Hyperforin.

Elektrophysiologische Untersuchungen an chromaffinen Nebennierenzellen im whole cell Patch Clamp-Verfahren sollten eine Charakterisierung des durch OAG und Carbachol ausgelösten Stromes ermöglichen. Zunächst wurden Messungen an stabil TRPC6 stabil überexprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt („Positivkontrollen“). In den Versuchsreihen konnten TRPC6-spezifische Ströme bei Applikation von OAG und Carbachol nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich, dass sich die in den Calcium-Imaging-Versuchen detektierte Zunahme der  $[Ca^{++}]_i$  mit der Aktivierung von TRPC6 deckt. Überraschender Weise konnte in den Messungen an chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen nach Applikation von OAG keinerlei Stromänderung gemessen werden. Durch die Applikation von Carbachol konnte lediglich ein kleiner, transienter, einwärts gerichteter Strom ausgelöst werden, ein TRPC6-typischer Strom konnte hingegen nicht gemessen werden. Aus diesem Grund erfolgten Messungen mit moduliertem Messprotokoll: 1.) Messung mit 0 mV Haltepotential zum Ausschluss einer Überlagerung eines TRPC6-Stroms durch spannungsabhängige Natrium- und

Calcium-Ionenkanäle, 2.) Messung mit 10 mM CsCl enthaltender Badlösung zur Elimination des Einflusses von Kalium-Ionenkanälen auf das Messergebnis und 3.) Messungen mit nur 200  $\mu$ M Calcium enthaltender Badlösung zur Verstärkung von TRPC6-Strömen. TRPC6 wird durch höhere Calciumionen-Konzentrationen gehemmt, bei niedrigen Calciumionen-Konzentrationen ist eine stärkere Aktivierung zu beobachten (Shi et al., 2004). Auch unter den modulierten Bedingungen waren jedoch keine TRPC6-typischen Ströme detektierbar. Weshalb keine zusätzlichen Ströme bei OAG- und keine TRPC3/-6/-7-typischen Ströme bei Carbachol-Applikation detektierbar waren, ist letztlich unklar. Weitere Untersuchungen könnten Aufschluss darüber geben, ob beispielsweise eine Koppelung an spannungsabhängige Calciumionen-Kanäle oder eine Hemmung durch Calmodulin zu o.g. Ergebnissen geführt hat.

## 1.2 Abstract

A rise in intracellular free calcium ion concentration ( $[Ca^{++}]_i$ ) leads to a release of catecholamines from adrenal chromaffin cells into the blood. The contribution of voltage-gated calcium channels has been intensively studied over the past years, whereas the contribution of other channel proteins in calcium signaling of chromaffin cells is mainly unknown. The experiments described in this dissertation were carried out with adrenal chromaffin cells to evaluate the contribution of classical transient receptor potential Ion channel 6 (TRPC6) in calcium signaling in adrenal chromaffin cells. Moreover chromaffin cells are a renowned model to study catecholamine secretion and the involved signal transduction cascades in neuronal cells.

Within this work the transcription and expression of TRPC6 in mouse adrenal chromaffin cells could be proved, using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot technique. The TRPC6 ion channel is a calcium-permeable cation channel which can be activated by 1-oleyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG), a membrane-permeable analogue of the second messenger diacylglycerol. The aim of this study was first-time functional investigation of TRPC6 in mouse adrenal chromaffin cells. The aim of this study is the first-time functional investigation of TRPC6 in mouse adrenal chromaffin cells in order to obtain a better understanding of the regulation of physiological and pathophysiological stress reactions.

For the functional characterization of TRPC6 in mouse adrenal chromaffin cells, calcium imaging experiments were carried out. Positive controls were performed on human embryonic kidney (HEK 293) cells expressing TRPC6. 100 seconds after the start of the measurement 100 $\mu$ M OAG was applied. For this concentration, a clear activation of TRPC6 channels was described (Hofmann et al., 1999). After 800 seconds, 500  $\mu$ M Carbachol was applied to check reability of the cells. Both HEK 293 cells and adrenal chromaffin cells express muscarinic acetylcholine receptors, which among others trigger calcium release from the endoplasmic reticulum via Inositol-1,4,5-triphosphate (Atwood et al., 2011; Huppelsberg and Walter, 2005; Garcia et al., 2006). In addition, an indirect activation of TRPC6 should be investigated. The stimulation of muscarinic acetylcholine receptors with the subsequent production of diacylglycerol represents a possible pathway of physiological activation of TRPC6, as well as a physiological pathway of activation of chromaffin-adrenal cells (Huppelsberg and Walter, 2005). OAG induced a significant calcium entry in TRPC6 overexpressing HEK 293 cells. Muscarinergic stimulation via Carbachol led to an immediate rise in  $[Ca^{++}]_i$ , mediated mainly by the release of calcium ions from intracellular stores. In calcium fluorimetric analyses mouse adrenal chromaffin cells showed a stable, oscillatory increase in fluorescence ratio (i.e. increase of intracellular calcium concentration) after application of OAG, when measured in calcium containing bath solution. In contrast to the above-mentioned analyses, in calcium-free bath

solution almost no increase in intracellular calcium concentration could be detected. This indicates that the main part of the OAG- and Carbachol-mediated increase in  $[Ca^{++}]_i$  in mouse adrenal chromaffin cells is dependent on extracellular calcium (calcium influx; calcium induced calcium release).

Shortly before the start of this study Hyperforin, a main constituent of St. John's Wort was described to selectively activate of TRPC6 (Leuner et al., 2007). With this it seemed to be possible to differentiate OAG-activated currents into those carried out by TRPC6 and those carried out by TRPC3/-7. In whole cell patch clamp measurements with HEK 293 cells stably over-expressing TRPC6, a clear increase in current was observed when Hyperforin was applied. The induced current showed a nearly linear voltage dependency with a reverse potential of about -10 mV. In calcium-free bath solution, the inward component of the current was almost completely absent. In addition the reverse potential shifted to lower levels. The current increase could also be detected in the same way even in untransfected HEK 293 cells in calcium-containing or calcium-free bath solution, but here it was only half as large. The increase in current density could also be seen in untransfected HEK 293 cells, but was only half as large as seen in HEK 293 cells stably expressing TRPC6. The current thus differed strongly from the currents which could be measured under application of OAG or Carbachol (see below). A specific and sole activation of TRPC6 by Hyperforin could not be demonstrated. For this reason, no further measurements were performed with Hyperforin.

Electrophysiological investigations on mouse adrenal chromaffin cells using the whole-cell patch clamp technique should help to characterize the currents elicited by application of OAG and Carbachol. First, measurements were made on HEK293 cells stably overexpressing TRPC6 ("positive controls"). TRPC6-specific currents were detected during the application of OAG and Carbachol. In addition, it could be shown, that the increase in  $[Ca^{++}]_i$  in the Calcium imaging experiments matches with the activation of TRPC6. Surprisingly there was no change in current density detectable following application of OAG. The application of Carbachol only led to a small, transient inwardly directed current, but a current typical for TRPC6 could not be seen. For this reason, measurements were made with modulated measurement protocols: 1.) measurements at a holding potential of 0 mV to exclude an overlap of a TRPC6 current by voltage-dependent sodium and calcium ion channels, 2.) measurements with 10 mM CsCl-containing bath solution to eliminate the influence of potassium ion channels on the measurement result, and 3.) measurements with a bath solution containing only 200  $\mu$ M calcium to amplify TRPC6 currents. TRPC6 currents are inhibited by higher concentrations of calcium ions. At lower concentrations a higher activation of TRPC6 is observed (Shi et al., 2004). Even under the modulated conditions, however, no TRPC6-typical currents were detectable. It is unclear, why there were no currents typical for TRPC6 or TRPC3/-7 detectable.

Further studies might elicit whether for example an interaction with voltage-gated calcium channels or with Calmodulin led to the above mentioned results.

## 2 Einleitung

### 2.1 Nebennieren

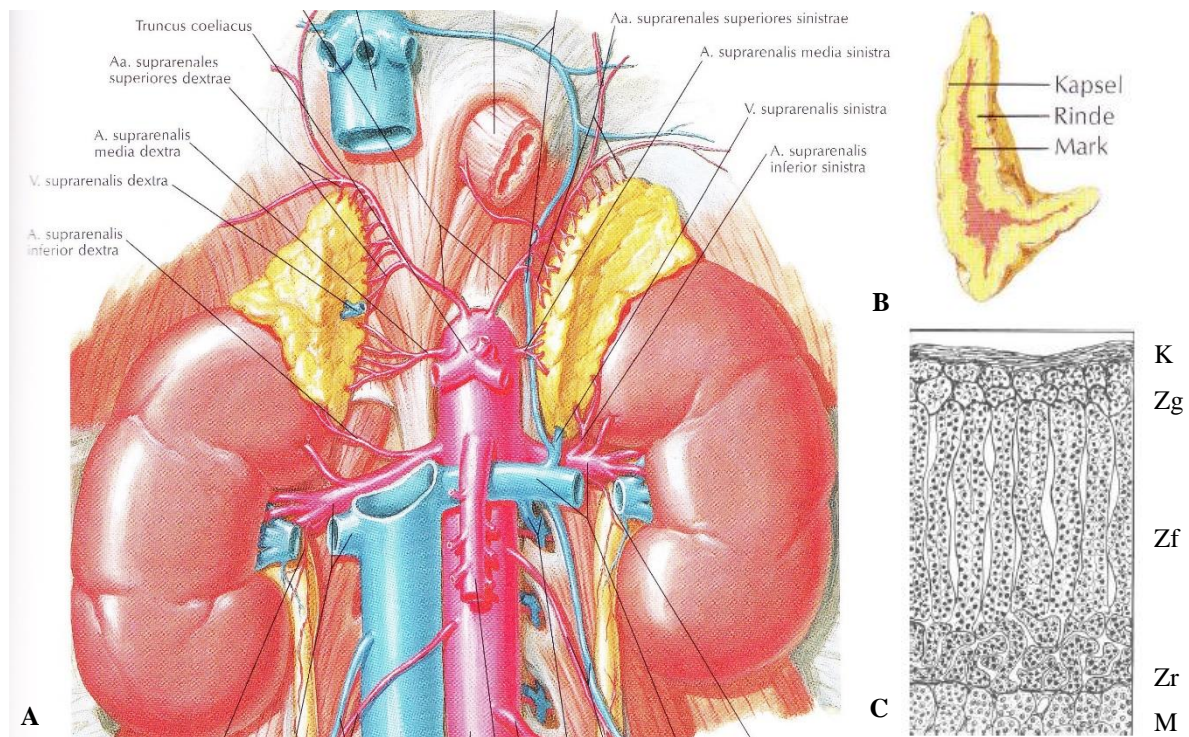
#### 2.1.1 Allgemeines

Die Nebennieren (*Glandulae adrenales*) sind paarig angelegte Hormondrüsen, die sich aus je zwei Organen unterschiedlicher Funktion zusammensetzen: dem Adrenalorgan (Nebennierenmark) und dem Interrenalorgan (Nebennierenrinde, s. Abb. 2.1 B). Ersteres entsteht in der siebten bis achten Entwicklungswoche aus der Sympathikusanlage, welche ektodermalen Ursprungs ist, letzteres entwickelt sich in der fünften bis siebten Entwicklungswoche aus dem mesodermalen Zölomepithel. Die Nebennieren liegen, umgeben von Nierenfettkapsel und Nierenfaszie, den Nieren auf. Während die linke Nebenniere halbmondförmig ist, ist die Rechte von dreieckiger Form. Da sich die Nebennieren an Ort und Stelle entwickeln, befinden sie sich auch bei fehlerhaftem Aszensus oder einem Absinken der Nieren am ihnen angestammten Platz (Waldeyer, 2007).

Die arterielle Versorgung der Nebennieren erfolgt über drei Gefäßgruppen: die A. suprarenalis superior, welche aus der A. phrenica inferior abgeht, die A. suprarenalis media aus der Aorta, z.T. auch aus dem Truncus coeliacus, sowie die A. suprarenalis inferior aus der A. renalis (s. Abb. 2.1 A). Unterhalb der Organkapsel bildet sich aus diesen Arterien ein Gefäßgeflecht, von dem aus kleine Gefäße durch die Rinde ziehen. Im Mark erweitern sie sich schließlich zu Sinusoiden. Diese münden in die zentrale Markvene, welche als V. suprarenalis die Nebenniere im Bereich des Hilums verlässt und links in die V. renalis, rechts direkt in die V. cava inferior mündet. Die äußerst hohe vegetative Innervation der Nebennieren erfolgt über den Plexus suprarenalis, welcher aus Fasern des Plexus coeliacus und des N. Splanchnicus major gebildet wird (Waldeyer, 2007).

Histologisch lässt sich die Nebenniere in vier Bereiche unterteilen, von denen die äußeren drei auf die Nebennierenrinde entfallen. Dies sind von außen nach innen die Zona glomerulosa, eine Schicht knäuelartig angeordneter acidophiler Zellen, welche Mineralocorticoide produzieren, die breite Zona fasciculata, welche durch parallel angeordnete Stränge Glucocorticoid-produzierender lipoider Zellen gekennzeichnet ist, sowie die Zona reticularis, bestehend aus kleinen, pigmentierten, netzförmig angeordneten acidophilen Zellen, welche Sexualhormone produzieren. Hieran schließt sich, zentral gelegen, das Nebennierenmark an (Abb. 2.1 C; Waldeyer, 2007).





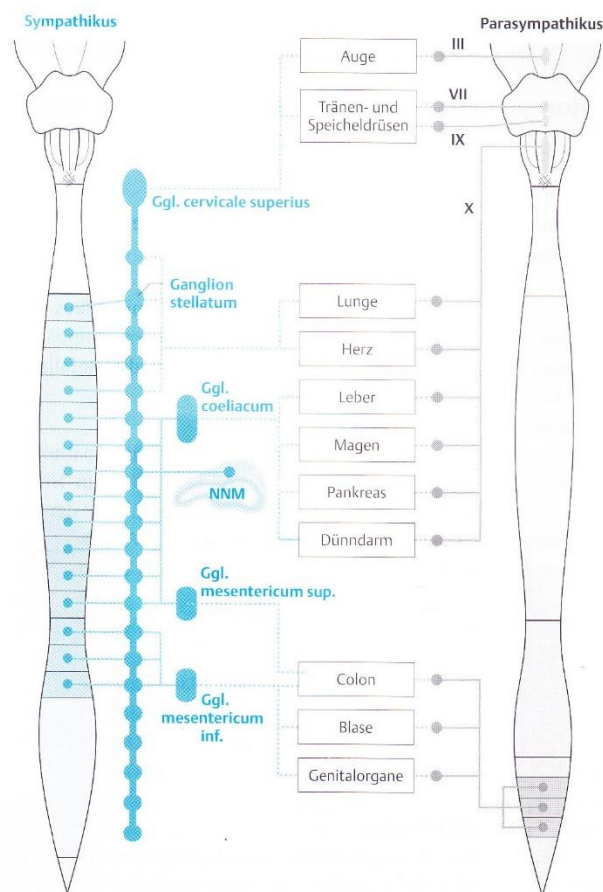
### Abb. 2.1: Makroskopische und mikroskopische Anatomie der Nebennieren

Abbildung 2.1 A zeigt die anatomische Lage der Nebennieren in Bezug zu den Nieren, inklusive der Gefäßversorgung. (B) zeigt die makroskopische Untergliederung der Nebenniere in Nebennierenrinde und -Mark (aus: Netter FH, 1995, Tafel 318 und 329). In (C) ist die histologische Gliederung der Nebenniere dargestellt mit K: Kapsel, den drei Schichten der Nebennierenrinde: Zg: Zona glomerulosa, Zf: Zona fasciculata, Zr: Zona reticularis und M: Nebennieren-Mark (aus: Tackmann W (1999), Abb. 87, S. 152

## 2.1.2 Vegetatives Nervensystem

Über das vegetative Nervensystem werden die Funktionen der verschiedenen Organe den aktuellen Bedingungen des Körpers angepasst. Dabei gibt es zwei gegenläufig agierende Systeme: zum einen das sympathische System, welches eine allgemein aktivierende (ergotrope) Qualität hat ("fight or flight-Reaktionen"), zum anderen das parasympathische System mit einer der Erholung und dem Speicheraufbau dienenden Qualität (trophotrop). Da das vegetative Nervensystem zum größten Teil über unbewusste Reaktionsmuster gesteuert wird, wird es auch "autonomes Nervensystem" genannt. Die zentrale Steuerung der vegetativen Funktionen geschieht durch übergeordnete Regulationszentren vor allem im Hypothalamus (Steuerung von Schlaf-Wach-Rhythmus, Körpertemperatur, Wasserhaushalt), im limbischen System (Emotionen und Affekte) und in der Formatio reticularis (Integration verschiedener Informationen aus dem Hypothalamus, vegetative Reflexe). Von dort aus werden die Informationen über ein Zwei-Neuronen-System, deren Erstes jeweils zentral, das Zweite peripher liegt, an die jeweiligen Organe weitergegeben. Während die zentralen Neurone des Parasympathikus im Hirnstamm und im Sakralmark liegen und die zweiten parasympathischen Neurone in Ganglien nahe der Zielorgane, liegen die zentralen Neurone des

Sympathikus in den Seitenhörnern des thorakolumbalen Rückenmarks (C8-L2) im Nucleus intermediolateralis. Von dort aus ziehen Fasern über die Rami communicantes albi in die paravertebral gelegenen sogenannten Grenzstrangganglien. Dort erfolgt zumeist die Umschaltung auf postganglionäre Fasern, welche zu den Organen ziehen. Die sympathischen Fasern einiger Bauchorgane werden in zentralen (nicht einzelnen Organen anliegenden) Ganglien umgeschaltet (Abb. 2.2).



### Abb. 2.2: Das vegetative Nervensystem

Legende: Durchgezogene Linien: erstes Neuron, gestrichelte Linien: zweites Neuron.

Die zentralen Neurone des Parasympathikus liegen im Hirnstamm und im Sakralmark, die zweiten parasymphathischen Neurone befinden sich in Ganglien nahe der Zielorgane. Die zentralen Neurone des Sympathikus liegen in den Seitenhörnern des thorakolumbalen Rückenmarks (C8-L2). Von dort aus ziehen Fasern über die Rami communicantes albi in die paravertebral gelegenen Grenzstrangganglien. Dort erfolgt zumeist die Umschaltung auf postganglionäre Fasern, welche zu den Organen ziehen. Die sympathischen Fasern einiger Bauchorgane werden in zentralen (nicht einzelnen Organen anliegenden) Ganglien umgeschaltet (aus: Huppelsberg und Walter, 2005, Abb. 14.1, S. 280).

Der bei der Reizübermittlung verwandte Neurotransmitter ist zwischen erstem und zweitem vegetativem Neuron immer Acetylcholin. Die Übermittlung erfolgt stets über nikotinische Acetylcholinrezeptoren, also mehrheitlich Natrium und Calcium leitende Rezeptor-Ionenkanäle. Im parasymphathischen System erfolgt auch die Reizübermittlung vom zweiten Neuron auf das Zielorgan über Acetylcholin, hier jedoch über G-Protein-gekoppelte, so genannte muskarinerge

Acetylcholinrezeptoren. Im sympathischen System wird mit Ausnahme der Schweißdrüsen Noradrenalin als Neurotransmitter der zweiten Synapsen verwandt (Waldeyer 2003; Huppelsberg und Walter, 2005).

### **2.1.3 Nebennierenmark**

Histologisch gesehen besteht das Nebennierenmark überwiegend aus polyedrischen, basophilen, so genannten chromaffinen Zellen. Die Bezeichnung rührt daher, dass sich diese Zellen zur histologischen Untersuchung gut mit Chromsalzen braun anfärben lassen. Die chromaffinen Zellen lassen sich in Adrenalin produzierende, sogenannte A-Zellen (ca. 80%), sowie Noradrenalin produzierende N-Zellen (ca. 20%) unterteilen. Zudem finden sich Blutgefäß- und Stützzellen.

Da das Nebennierenmark entwicklungsgeschichtlich dem sympathischen Nervensystem entstammt, kann das Nebennierenmark als spezialisiertes sympathisches Ganglion und die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks als spezialisierte zweite Neurone des Sympathikus angesehen werden. Entsprechend werden die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks von präganglionären sympathischen Fasern aus dem Rückenmark angesteuert; die Signaltransduktion erfolgt somit auch hier über Acetylcholin. Im Unterschied zu den sonstigen sympathischen Ganglien geben die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks jedoch ihre Neurotransmitter (zu ca. 80% Adrenalin und nur zu ca. 20% Noradrenalin, entsprechend der Häufigkeit der o.g. A- und N-Zellen) nicht über einen synaptischen Spalt an ein Zielorgan, sondern direkt in das Blut ab. Über diese besondere hormonelle Funktion ist es möglich, alle Teile des Körpers gleichzeitig und direkt zu beeinflussen. Somit funktioniert die Nebenniere als endokrine, d.h. hormonelle Drüse, die mit der Ausschüttung ihrer Botenstoffe die Funktion des ganzen Körpers direkt beeinflusst. Diese Wirkung beinhaltet die Erhöhung von Herzfrequenz, Herz-Auswurfleistung und Blutdruck, sowie der Energiebereitstellung, letztere durch Mobilisierung der Glycogenreserven der Leber, vermehrte Lipolyse und Insulinausschüttung. Zudem kommt es unter dem Einfluss der Nebennierenmark-Hormone zu einer Weitstellung von Pupillen und Bronchien. Alle diese Effekte zielen auf eine adäquate Anpassung des Menschen an Belastungssituationen ab; man spricht in diesem Zusammenhang auch zusammenfassend von der „fight or flight“-Reaktion. Entsprechend wird die Adrenalin- und Noradrenalin ausschüttung durch jegliche Form von Belastung (Anstrengung, Hitze, Angst, Stress) getriggert. Weitere Effekte der Nebennierenmarkhormone sind unter anderem die Hemmung der Wehentätigkeit und die Aktivierung der Organsphinkter (Waldeyer, 2003; Huppelsberg und Walter, 2005; Diaz-Flores et al., 2008).

## 2.2 Signaltransduktion zwischen Zellen

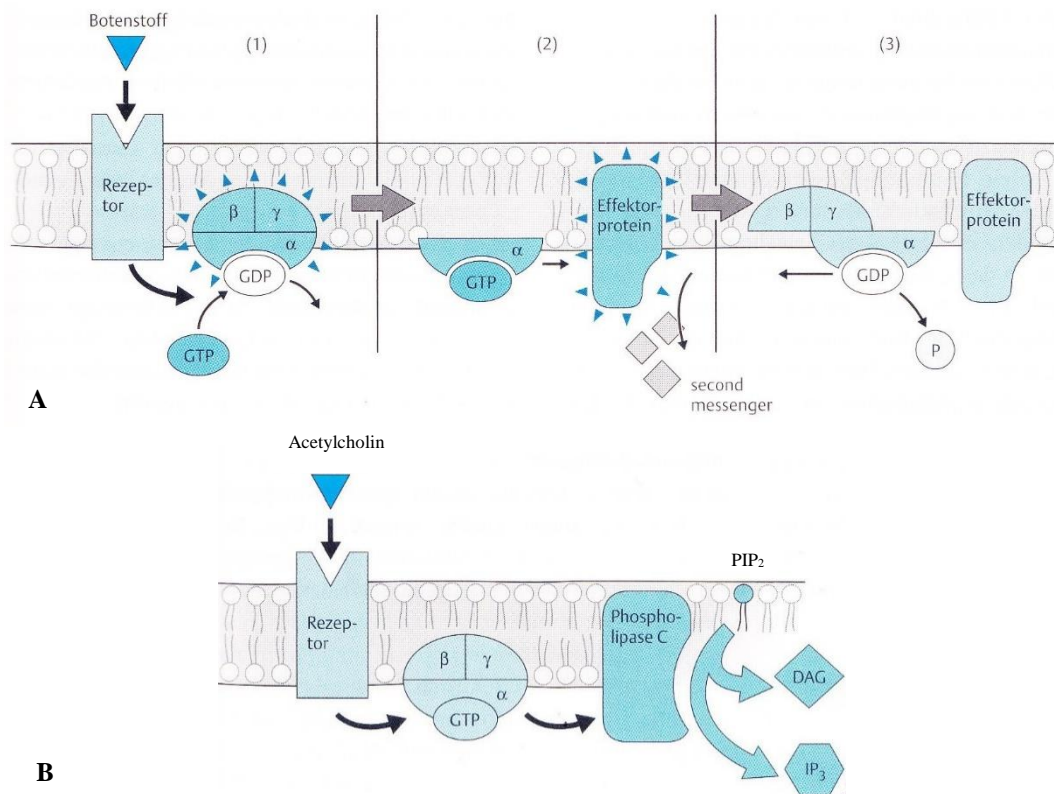
### 2.2.1 Allgemeines

Um eine Homöostase, also ein harmonisches Zusammenspiel der einzelnen Zellen im Körper zu erreichen und damit überhaupt erst eine physische Existenz als solcher zu ermöglichen, ist es notwendig, dass die einzelnen Zellen untereinander kommunizieren. Hierzu haben sich im Laufe der Entwicklung mehrere Wege etabliert. Neben der Möglichkeit einzelner Zellarten, Informationen in Form elektrischer Potentialveränderungen über Zell-Zell-Kontakte direkt an die Nachbarzellen weiterzugeben (z.B. Muskelzellen) und der Möglichkeit einiger Hormone, direkt in die Zellkerne der Zielzellen einzudringen und dort die Aktivität von Genen zu beeinflussen (z.B. Steroid-Hormone), werden viele Zellsignale über freigesetzte Botenstoffe übermittelt. Diese binden an Rezeptoren der Zielzellen und setzen dort Informationskaskaden in Gang. Hierbei spielen zwei Gruppen von Rezeptoren eine wichtige Rolle: zum einen die sogenannten Rezeptor-Ionenkanäle („ionotrope Rezeptoren“), bei denen die Bindung eines Botenstoffes die Öffnung eines Ionenkanals und damit über einen Ioneneinstrom eine Änderung des Zellpotentials bewirkt (beispielsweise nikotinische Acetylcholinrezeptoren, „nAChR“), zum anderen sogenannte metabotrope Rezeptoren (z.B. muskarinerge Acetylcholinrezeptoren, „mAChR“; Huppelsberg und Walter, 2005).

### 2.2.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Signaltransduktionskaskaden

Metabotrope Rezeptoren sind Rezeptoren, an welche sogenannte G-Proteine (Guanylnucleotid-bindende Proteine) gekoppelt sind. Diese bestehen aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Die  $\alpha$ -Einheit hat in Ruhe Guanosin-5'-diphosphat (GDP) gebunden. Kommt es zu einer Rezeptor-Aktivierung, so wird das energieärmere GDP gegen ein energiereicheres Guanosin-5'-triphosphat (GTP) ausgetauscht. In der Folge dissoziiert die  $\alpha$ -Einheit des G-Proteins von der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Einheit und beeinflusst ihrerseits Effektorproteine, welche sogenannte *Second Messenger*-Kaskaden in Gang setzen (s. Abb. 2.3 A). Wichtige Beispiele solcher Effektorproteine sind zum einen die Adenylatcyclase, über welche die Bildung des wichtigen Second Messenger-Botenstoffs cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) beeinflusst wird (z.B. mAChR der Untergruppen 2 und 4), zum anderen die Phospholipase C. Diese spaltet nach Aktivierung Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). Ersteres ist in der Lage, Calciumionen aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Reticulum freizusetzen, Letzteres aktiviert die Proteinkinase C, welche wiederum über eine Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen Einfluss auf das Zellgeschehen,

insbesondere auch über die Steuerung der sogenannten „early response“-Gene nimmt. Zudem aktiviert es direkt Kanalproteine (s. 2.3.5.5). Typische Beispiele für auf diese Art arbeitende Rezeptoren (so genannte "G<sub>q/11</sub>-Rezeptoren") sind die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) der Untergruppen 1, 3 und 5 (Abb. 2.3B; Huppelsberg und Walter, 2005; Gulbins und Lang, 2010; Silbernagl und Despopoulos, 2012).



**Abb. 2.3: Funktionsschema G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**

(A): Bei einer Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wird an der  $\alpha$ -Einheit gebundenes GDP gegen GTP ausgetauscht. In der Folge dissoziiert die  $\alpha$ -Einheit von der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Einheit und beeinflusst ihrerseits Effektorproteine, welche Second Messenger-Kaskaden in Gang setzen. (B) zeigt die Funktionsweise der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren mAChR 1, 3 und 5 mit Bildung von IP<sub>3</sub> und DAG (nach: Huppelsberg und Walter, 2005, Abb. 1.1 und 1.3, S. 9).

### 2.2.3 Calcium

Calcium ist ein Erdalkalimetall, das in gelöster Form als zweiwertiges Kation vorkommt. Im menschlichen Körper spielt Calcium eine überaus wichtige Rolle: Erstens ist es ein Hauptbestandteil der Knochensubstanz Calciumapatit; 99 % des gesamten Körper-Calciums finden sich hier. Zweitens beeinflussen Calciumionen das Membranpotential besonders der Herzmuskelzellen, einerseits durch eine Calciumioneneinstrom-vermittelte Depolarisation der Zellen, andererseits durch eine elektrische Stabilisierung der Zellmembranen durch „Pufferung“ negativ geladener Phospho- und Glycopeptiden. Drittens stellen Calciumionen selbst einfache, aber überaus wichtige



Signaltransmitter im Bereich von Second Messenger- und Reaktionskaskaden dar (Huppelsberg und Walter, 2005).

## 2.2.4 Calcium-Signale

In Ruhe ist die Konzentration an Calciumionen im Zellinneren mit  $10^{-5}$  bis  $10^{-4}$  mM im Gegensatz zum Zelläußeren (ca. 2 mM) und zu Calcium speichernden Zellorganellen wie dem Endoplasmatischen Reticulum (ca. 0,5-0,8 mM; Alonso et al., 1999) sehr gering. Durch Öffnung von Ionenkanälen in der Zellmembran oder in Zellorganellen steigt die zytoplasmatische freie Calciumkonzentration ( $[Ca^{++}]_i$ ) an. Diese Konzentrationserhöhung führt zum Teil direkt, zum Teil durch Beeinflussung der Aktivitäten im Zellkern, zum Teil über die Aktivierung von Hilfsproteinen zu einer Reihe unterschiedlichster Effekte. Calmodulin beispielsweise kann bis zu vier Calciumionen binden und in dieser aktivierten Form eine Vielzahl von Enzymen aktivieren. Zu den durch Calcium vermittelten Reaktionen zählten die Muskelkontraktion, die Blutgerinnung (Plättchenaktivität), die Migration von Leukozyten, aber auch von Tumorzellen, die Aktivität einiger sensorischer Zellen, der Schluss von Zell-Zell-Verbindungen (Gap Junctions), die Steuerung von Kanälen anderer Ionen, die Motilität der Spermien, die Apoptose, sowie die Freisetzung von Botenstoffen aus hormonproduzierenden Zellen, auto- und parakrinen Zellen und Nervenendigungen (Huppelsberg und Walter, 2005; Gulbins und Lang 2010).

Die Erhöhung der  $[Ca^{++}]_i$  in Zellen wird durch verschiedene, an die jeweilige Zellfunktion angepasste Mechanismen vermittelt. Zunächst ist zu unterscheiden zwischen einem Calciumionen-Einstrom von außen und einer Calciumionen-Freisetzung aus in der Zelle liegenden Organellen. Ersterer lässt sich weiter unterteilen in einen Calciumionen-Einstrom durch spannungsaktivierte Calciumkanäle (voltage-operated calcium channels, „VOCC“), durch Kanäle, die durch Botenstoffe aktiviert werden (receptor-operated calcium channels, „ROCC“) und durch Kanäle, die aktiviert werden, wenn die  $IP_3$ -sensitiven Calciumspeicher entleert wurden (store-operated calcium entry, „SOCE“, auch "Calcium-release activated Calcium current,  $I_{CRAC}$ ). Die spannungsabhängigen Calciumkanäle lassen sich unterteilen in Kanäle mit niedriger Aktivierungsschwelle und Kanäle mit hoher Aktivierungsschwelle. Zu den erster gehören die T-Typ-Kanäle ("transient"; u.a. in Neuronen, Schrittmacherzellen, Muskelzellen), zu letzteren alle anderen: die L-Typ-Kanäle ("long lasting", auch "Dihydropyridinrezeptoren"; u.a. in Muskelzellen), N-Typ-Kanäle ("neither L, nor T"; u.a. in Neuronen), P-/Q-Typ-Kanäle ("Purkinje"; u.a. im Kleinhirn) und R-Typ-Kanäle ("remaining"; u.a. im Cerebellum und anderen Neuronen). All diesen Kanälen ist gemein, dass sie durch eine Depolarisation der Zelle, beispielsweise nach Öffnung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren aktiviert werden und einen Calciumionen-Einstrom in die Zelle ermöglichen. Alle bestehen aus einer  $\alpha$ -

Untereinheit, welche die Pore bildet, sowie einigen weiteren Proteinen, u.a. einer  $\beta$ -Untereinheit, welche intrazellulär liegt. Eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten der Untereinheiten ermöglicht dabei, unterschiedliche Funktionen zu bedienen (Berridge et al., 2000; Garcia et al., 2006; Catterall et al., 2014).

Zur Gruppe der Rezeptor-gesteuerten Calciumkanäle zählt z.B. der nikotinische Acetylcholinrezeptor, welcher u.a. für die Signalweitergabe in vegetativen Synapsen (s.o.) und an der muskulären Endplatte notwendig ist. Auch viele TRP-Kanäle ("Transient Receptor Potential", s.u.), z.B. TRPC3, -6 und -7 werden zu den Rezeptor-gesteuerten Calciumkanälen gerechnet. Des Weiteren z.B. die P2X-Rezeptoren, welche durch ATP aktiviert werden und die Aktivität des Herzens und den Gefäßtonus steigern, Plättchen und Leukozyten aktivieren und in der Apoptose eine Rolle spielen, sowie Temperatur-, Mechano- (z.B. "TRPA-Kanäle") und Licht-Sensoren ("TRPL-Kanäle"; Wu et al., 2010; Alexander et al., 2013).

Der Speicher-gesteuerte Calciumionen-Einstrom ("SOCE") wird durch die Proteine STIM ("stromal interaction molecule", ein Calcium-Sensor im Endoplasmatischen Reticulum) und ORAI (auch: "Calcium-release activated calcium channel", kodiert durch die ORAI-Gene) vermittelt (Mercer et al., 2006), wobei sich bei Calciummangel in intrazellulären Speichern STIM zu Clustern vereinigt und ORAI in der Zellmembran aktiviert, was einen Calciumionen-Einstrom in die Zellen ermöglicht (Park et al., 2009).

Die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern erfolgt ebenfalls über Ionenkanäle. Ein Beispiel sind die Ryanodin-Rezeptoren des sarkoplasmatischen Reticulums von Skelett- und Herzmuskelzellen. In Skelettmuskelzellen werden sie nach einer Depolarisation und einer konsekutiven Konformationsänderung der Dihydropyridinrezeptoren, mit denen sie direkt verbunden sind, aktiviert und ermöglichen so einen schnellen Einstrom von Calciumionen ins Sarkoplasma und eine Kontraktion der Muskeln (Ryanodin-Rezeptoren Typ I). In Herzmuskelzellen strömen bei einem Aktionspotential u.a. Calciumionen in die Zellen ein und aktivieren Calcium-sensitive Ryanodin-Rezeptoren (Typ II; CICR: Calcium-induced Calcium Release/Calcium-induzierte Calciumfreisetzung). Ein weiteres Beispiel sind die  $IP_3$ -Rezeptoren, welche nach Bindung des Second Messengers  $IP_3$  Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Reticulum freisetzen. Zudem gibt es Calciumkanäle, welche sowohl in der Plasmamembran, als auch in den Membranen intrazellulärer Organellen nachgewiesen werden konnten. Beispiele sind der Kanal TRPC1 und die TRPML-Kanäle (Wu et al., 2010; Alexander et al., 2013).

### 2.2.5 Calcium-Signale in Nervenendigungen

In Nervenzellen haben Calciumionen als Kationen mit einem nach innen gerichteten Konzentrationsgradienten Anteil an der Depolarisation, jedoch durch Aktivierung Calcium-aktivierter Kaliumkanäle auch an der Repolarisation. Zudem kommt Calcium eine essentielle Rolle in der Signalweitergabe über chemische Synapsen zu. In einem ersten Schritt verbinden sich Calciumionen, welche über spannungsaktivierte Calciumkanäle im Bereich der präsynaptischen Endigung in Nervenzellen eingeströmt sind, mit Calmodulin zu einem Komplex. Dieser ermöglicht über eine Phosphorylierung der Proteinkinase II eine Abspaltung von Synapsin von Neurotransmitter enthaltenden Vesikeln. Dadurch werden sie aus ihrer Halterung am Aktinskelett nahe der Nervenendigung herausgelöst (Hirokawa et al., 1989; Benfenati et al., 1992). In einem zweiten Schritt bewirken die Calciumionen eine Konformationsänderung im sogenannten v-SNARE-Komplex (Vesicula soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor), einem in der Vesikelmembran befindlichen Proteinkomplex aus Synaptobrevin und Synaptotagmin. Diese Konformationsänderung bewirkt eine Verschlingung des v-SNARE-Komplexes mit einem t-SNARE-Komplex („target SNARE“, aus Syntaxin und SNAP-25 bestehend) der präsynaptischen Membran, wodurch die Vesikelmembran der präsynaptischen Membran so stark angenähert wird, dass es zu einer Verschmelzung beider Membranen und damit zu einer Ausschüttung der Botenstoffe in den synaptischen Spalt kommen kann (Südhoff und Rizo, 2011).

### 2.2.6 Calcium-Signale in chromaffinen Nebennierenmarkzellen

Ähnlich den o.g. Prozessen spielen Calciumionen auch in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks eine zentrale Rolle bei der Signalweiterleitung und Transmitterfreisetzung: Bei Sympathikusaktivierung setzen präganglionäre sympathische Nervenendigungen im Nebennierenmark Acetylcholin frei. Dieses aktiviert Acetylcholinrezeptoren, was zu einer Calciumionenfreisetzung, sowie zu einem Kationeneinstrom über die Zellmembran und damit zu einer Depolarisation der Zellen führt. In der Folge kommt es zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen und einem konsekutiven Calciumionen-Einstrom in die Zellen. Durch die Erhöhung der  $[Ca^{++}]_i$  wird der Sekretionsapparat aktiviert und so die Freisetzung der Katecholamine ermöglicht.

Die Katecholaminfreisetzung aus chromaffinen Nebennierenzellen unterliegt einer feinen, mehrschichtigen Regulation, welche auf die jeweilige Situation abgestimmte Reaktionen ermöglicht. Einen wesentlichen Modulationspunkt stellen hierbei die Calciumsignale dar. So führen Transmitter wie ATP, Dopamin und endogene Opioide, welche zusammen mit den Katecholaminen aus den



Vesikeln freigesetzt werden, teilweise über direkte Kanalinteraktionen, teilweise über eine Stimulation von purinergen und Opioid-Rezeptoren im Rahmen G-Protein-gekoppelter Second Messenger-Kaskaden zu einer Hemmung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen und damit zu einer negativen Rückkopplung. Dagegen führen heftige vorangegangene Impulse zu einer Bahnung und somit zu einer Verstärkung der Sekretion. Neben diesen kurzfristig wirkenden Modulationen führt eine länger andauernde erhöhte Katecholaminsekretion, z.B. im Rahmen vital bedrohlicher Ereignisse über  $\beta$ -Adrenorezeptoren in der Zellmembran der chromaffinen Nebennierenzellen zu einer cAMP/Proteinkinase A-vermittelten Steigerung des Calciumioneneinstroms und somit zu einer der Situation angemessenen Katecholaminfreisetzung. Auch in diesem Rahmen bleibt jedoch o.g. negative Rückkopplung bestehen und verhindert überschießende Reaktionen.

Intrazellulär sorgen das Endoplasmatische Reticulum und die Mitochondrien dafür, dass die Calciumionen-Konzentrationserhöhungen einerseits möglichst lokalisiert, andererseits möglichst effektiv erfolgen. Dabei erfolgt durch das Endoplasmatische Reticulum u.a. über Ryanodinrezeptoren eine Verstärkung des Calcium-Signals im Bereich des sekretorischen Apparates. Dagegen sorgen die Mitochondrien mittels einer Uniporter-gesteuerten Aufnahme von Calciumionen dafür, dass die Calciumionen-Konzentrationserhöhung lokalisiert und andere sensible Bereiche wie der Zellkern davon ausgenommen bleiben. Zudem steigert die Calciumionenaufnahme die ATP-Bildung. Mittels Sarco-/Endoplasmatisches Reticulum-ATPase (SERCA) und Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA) wird der Calciumionen-Gradient aufrecht gehalten.

Unklar ist bisher, welche Subtypen spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle welche Aufgaben im Rahmen der Katecholaminsekretion übernehmen und welche für andere Aufgaben wie z.B. Proliferation oder Apoptose zuständig sind, zumal sich je nach Spezies der prozentuale Anteil der einzelnen Unterarten, die Zusammensetzung und die Verteilung z.T. deutlich unterscheidet. Ebenfalls ist kaum bekannt, inwieweit auch andere Kanäle in diesem Rahmen eine Rolle spielen (Garcia et al., 2006. S. auch Wu, Fann und Kao, 2010).

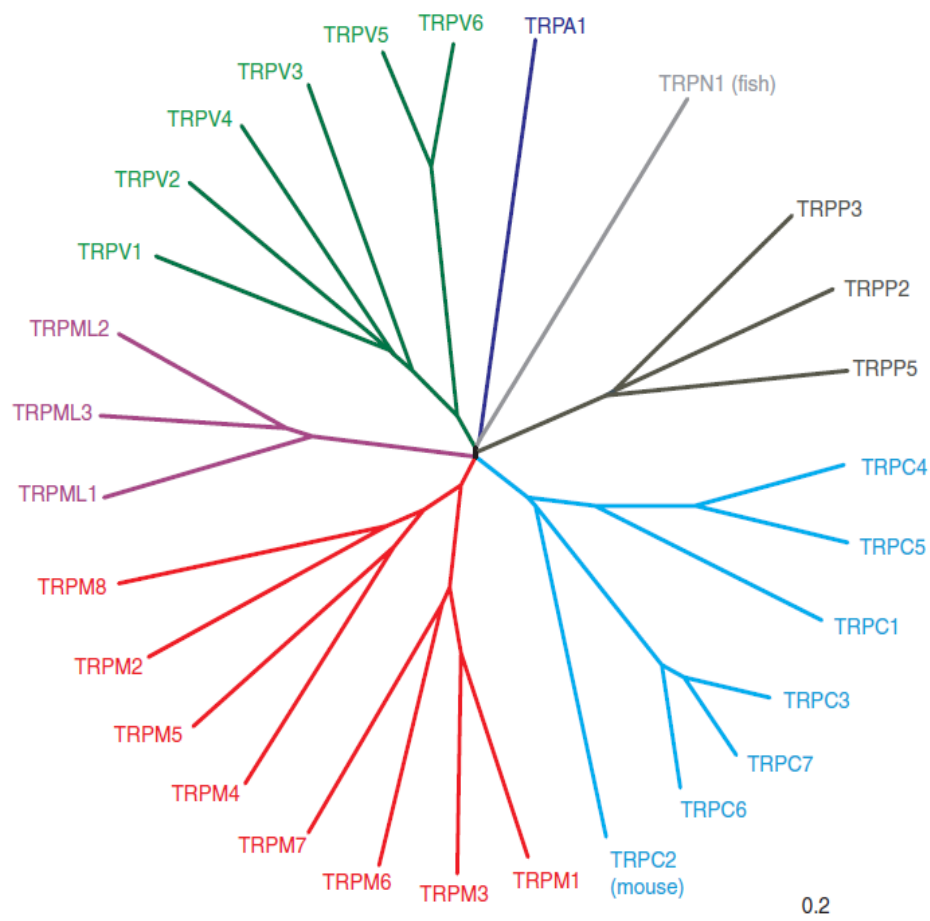
## **2.3 TRP-Kanäle**

### **2.3.1 Familie der TRP-Kanäle**

Die Familie der "Transient Receptor Potential"- (TRP-) Proteine umfasst eine Vielzahl mehr oder weniger Calcium-selektiver Kationenkanäle. Der Name der Familie geht zurück auf elektroretinographische Untersuchungen an blinden Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, bei denen im Gegensatz zu gesunden Fruchtfliegen auf einen Lichtreiz lediglich eine transiente Photorezeptor-Potentialänderung zu verzeichnen war (Cosens und Manning, 1969).

Molekulargenetische Untersuchungen führten zur Entdeckung eines in der Retina der Fliegen lokalisierten, mit mehreren transmembranären Untereinheiten versehenen Proteins (dTRP), welches deutliche Ähnlichkeiten zu verschiedenen Ionenkanälen aufwies (Montell und Rubin, 1989). Weitere Untersuchungen bestätigten seine Funktion als Ionenkanal und führten bis heute zur Identifizierung von über 50 homologen (TRP-) Proteinen, von denen mindestens 28 bei Säugetieren vorkommen (Gees et al., 2010).

Auf Grund von Aminosäuresequenz-Homologie-Studien lassen sich die TRP-Proteine in sieben Familien unterteilen (Abb. 2.4), die z.T. wieder in Subfamilien untergliedert sind: TRPC ("kanonisch" oder "klassisch"; so genannt, da dem zuerst beschriebenen dTRP am ähnlichsten), TRPV ("vanilloid"), TRPM ("Melastatin"), TRPA ("Ankyrin"), TRPML ("Mucolipin"), TRPP ("Polyzystin") und TRPN ("NO-Mechano-Potential-C-Kanal"), wobei letzterer nicht bei Säugetieren vorkommt (Clapham et al., 2005, Nilius und Owsianik, 2011).



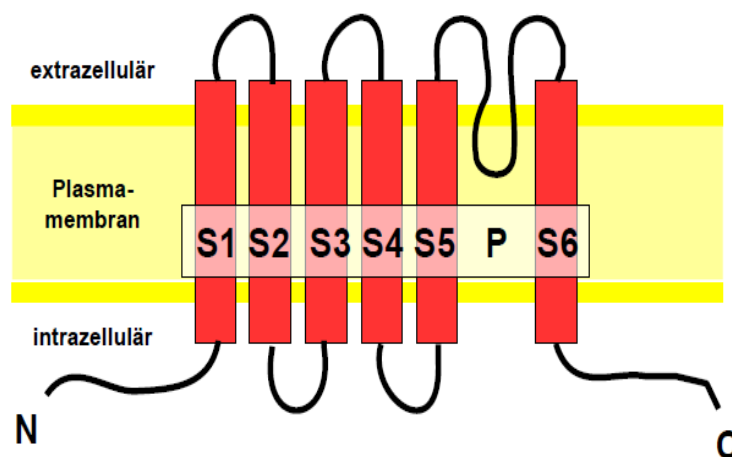
**Abb. 2.4: Phylogenetischer Baum der menschlichen TRP-Proteine**

Phylogenetischer Baum der menschlichen TRP-Proteine, erstellt auf Basis einer Sequenzhomologie-Analyse. Da TRPC2 beim Menschen ein Pseudogen ist und TRPN lediglich bei Zebrafischen und Wirbellosen vorkommt, wurden die Maus-Variante von TRPC2 und die Zebrafisch-Variante von TRPN verwendet, um die Beziehung aller Familien zueinander darzustellen. Die Länge des Skalierungsstriches repräsentiert den evolutionären Abstand der Kanäle, dargestellt in Substitutionen pro Aminosäure (aus: Nilius und Owsianik, 2011).

TRP-Proteine kommen in allen Geweben des Körpers vor. Gleichwohl gibt es jeweils Kanalspezifische Verteilungsmuster. Zudem kommen einige Kanäle in der Plasmamembran vor, während andere größtenteils intrazellulär zu finden sind. Wieder andere treten sowohl in Zell-Organellen, als auch in der Plasmamembran auf (Gees et al., 2010).

### 2.3.2 Struktur der TRP-Proteine

Obwohl die exakte Struktur der TRP-Kanäle bislang aufgrund fehlender Röntgen-Kristallographie-Untersuchungen nicht bekannt ist, deuten ausführliche molekularbiologische Untersuchungen darauf hin, dass TRP-Proteine sechs transmembranäre Segmente (S1-S6) aufweisen mit einer Porenregion zwischen S5 und S6 (Abb. 2.5). Sowohl das C-, als auch das N-terminale Ende des Proteins ist intrazellulär lokalisiert und je nach Art unterschiedlich lang. Beide Enden weisen Familien-überspannende Homologien auf: eine C-terminal von S6 gelegene sogenannte TRP-Box (ein mehr oder weniger konservierter Abschnitt der Aminosäuren "EWKFAR"), die bei allen TRPC-, TRPV- und TRPM-Proteinen vorkommt, Prolin-reiche Abschnitte, ebenfalls C-terminal von S6 gelegen bei TRPC-, TRPM- und einigen TRPV-Proteinen und eine N-terminal gelegene Ankyrin-reiche Region bei TRPC-, TRPV- und TRPA-Proteinen. Zudem können weitere funktionelle Bereiche je nach Art des Proteins nachgewiesen werden, z.B. enzymatische Aktivitäten bei einigen TRPM-Proteinen (Clapham, 2003; Ramsey et al., 2006).



**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung der angenommenen zweidimensionalen Struktur eines TRP-Proteins

N: N-Terminus, C: C-Terminus des Proteins, S1-S6: transmembranäre Segmente, P: Porenregion

Vergleiche mit Kanälen anderer Familien und die bisherigen Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass TRP-Kanäle aus vier Untereinheiten gebildet werden. Dabei sind sowohl Homo-, als auch Heteromultimere beschrieben, letztere z.B. für TRPC, TRPV, TRPM und TRPML, wobei die Heteromultimerisation wohl innerhalb der Familien stattfindet (Strubing et al., 2003; Schaefer, 2005;

Gees et al., 2010). Zudem ist die Einbindung von TRP-Kanälen in sogenannte "Signalplexe", Komplexe aus verschiedenen in Signalkaskaden eingeschalteten Proteinen, beschrieben. Diese Tatsache, verbunden mit der unterschiedlichen Verteilung der Kanäle auf Plasmamembran und intrazelluläre Organellen ermöglicht eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen je nach Zusammensetzung dieser Komplexe (Kim und Saffen, 2005; Suzuki et al., 2007).

### **2.3.3 Funktionelle Eigenschaften der TRP-Kanäle**

Die meisten TRP-Kanäle sind schwach spannungsabhängige, Calciumionen-permeable, nicht-selektive Kationenkanäle mit einer Bevorzugung von Calciumionen gegenüber Natriumionen von meist unter 10:1 ( $P_{Ca}/P_{Na} < 10$ ). Ausnahmen bilden lediglich die hoch Calcium-selektiven Kanäle TRPM3 $\alpha$ 2, TRPV5 und TRPV6 ( $P_{Ca}/P_{Na} > 100$ ), sowie die völlig Calcium-impermeablen, allein Monovalenz-durchlässigen Kanäle TRPM3 $\alpha$ 2, TRPM4 und TRPM5 ( $P_{Ca}/P_{Na} < 0.05$ ; Wu, Sweet und Clapham, 2010). Zwar sind inzwischen einige Stoffe bekannt, mit denen sich TRP-Kanäle aktivieren lassen, jedoch sind die endogenen Aktivierungswege noch größtenteils unbekannt. Die Aktivität der meisten TRP-Kanäle wird durch Aktivierung der Phospholipase C potenziert. Auch eine Vielzahl G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Gq/11, verbunden mit der Phospholipase C $\beta$ ) und Rezeptor-Tyrosinkinasen (verbunden mit der Phospholipase C $\gamma$ ) verstärken die Aktivität von TRP-Kanälen. PIP<sub>2</sub> verstärkt ebenfalls die Aktivität der meisten TRP-Kanäle. Zudem erfolgt bei vielen TRP-Kanälen eine Modulation der Aktivität durch Calciumionen-Konzentrationsänderungen (Wu, Sweet und Clapham, 2010). TRP-Kanäle sind in eine Reihe verschiedener Signalkaskaden eingebunden. Sie entfalten ihre Wirkung dabei über mehrere angenommene Wege:

- 1.) Werden TRP-Kanäle aktiviert, führt dies u.a. zu einem Anstieg von Calciumionen in den Zellen. Zudem kann die Aktivierung von TRP-Kanälen in erregbaren Zellen zu einer Depolarisation führen. Dies aktiviert wiederum spannungsgesteuerte Calciumkanäle und führt so zu einem weiteren Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration.
- 2.) Des Weiteren kann durch eine TRP-Aktivierung die treibende Kraft für Calciumionen über die Plasmamembran auch in nicht erregbaren Zellen verändert werden mittels Calcium-abhängiger Aktivierung de- oder hyperpolarisierender Ionenkanäle.
- 3.) Kann die Aktivierung von intrazellulär lokalisierten TRP-Kanälen zu einer Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern führen.

Je nach Lokalisation des Kanals und Einbindung in größere Signal-Komplexe kann so eine Vielzahl von Signalkaskaden aktiviert und Modulationen vorgenommen werden (Gees et al., 2010).

## **2.3.4 TRPC3/6/7-Subfamilie**

Die Familie der klassischen oder "kanonischen" TRP-Kanäle (TRPC) lässt sich in mehrere Gruppen unterteilen (s. Abb. 1). Eine der Untergruppen umfasst die Kanäle TRPC3, TRPC6 und TRPC7. Zwischen ihnen besteht eine Aminosäuresequenz-Homologie von ungefähr 75%. Die Kanalproteine formen sowohl Homo-, als auch Heteromultimere. Sie generieren nicht-selektive, doppelt-gleichrichtende Ströme mit einer Einzelkanal-Leitfähigkeit von 65, bzw. 35, bzw. 25 pS und einer relativ geringen Bevorzugung von Calciumionen gegenüber Natriumionen (Wu, Sweet und Clapham, 2010) nach Stimulation von  $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren (wie z.B. mAChR) oder experimenteller Applikation von OAG (1-Oleyl-2-acetyl-sn-glycerol), der membrangängigen Form von DAG. Letzterer Effekt ist unabhängig von der durch DAG stimulierten Proteinkinase C (Boulay et al., 1997; Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999).

Es sind unter anderem folgende Rezeptor-Modulationsmechanismen bekannt: TRPC3 und -6 zeigen Mono- und Diglycosylierungen im Bereich der extrazellulären Loops S1-S2 und S3-S4, wobei der Glycosylierungsstatus mit der basalen Aktivität der Kanäle korreliert (Dietrich et al., 2003). Die Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen Src und Fyn steigern die Aktivität von TRPC3 und -6 (Hisatsune et al., 2004; Vazquez et al., 2004). Die Aktivität von TRPC3 wird durch direkte Phosphorylierung durch die Proteinkinasen C und G herunterreguliert (Vekatachalam et al., 2003; Kwan et al., 2004). Die Aktivität des Kanals TRPC6 wird durch Veränderungen sowohl der extra-, wie auch der intrazellulären Calciumionen-Konzentration moduliert, wobei letzteres durch Calcium/Calmodulin vermittelt wird, während die Aktivität von TRPC7 dadurch gehemmt wird (Boulay, 2002; Shi et al., 2004).

Wie auch die meisten anderen TRP-Kanäle kommen die Kanäle der Subgruppe TRPC3 /-6 /-7 in einer Vielzahl von Geweben vor. Sie sind beispielsweise in die Steuerung des Wachstums von Nervenzellen im das zentralen Nervensystem und in die Regulation des Tonus von Muskelzellen insbesondere des Herz-Kreislauf-Systems eingebunden. Daneben ist inzwischen eine Vielzahl weiterer Funktionen entdeckt worden. Jedoch sind die genauen Regulationsmechanismen, in die die Kanäle eingebunden sind, noch weitestgehend unbekannt (Wu, Sweet und Clapham, 2010).

## **2.3.5 TRPC6**

### **2.3.5.1 Genetik**

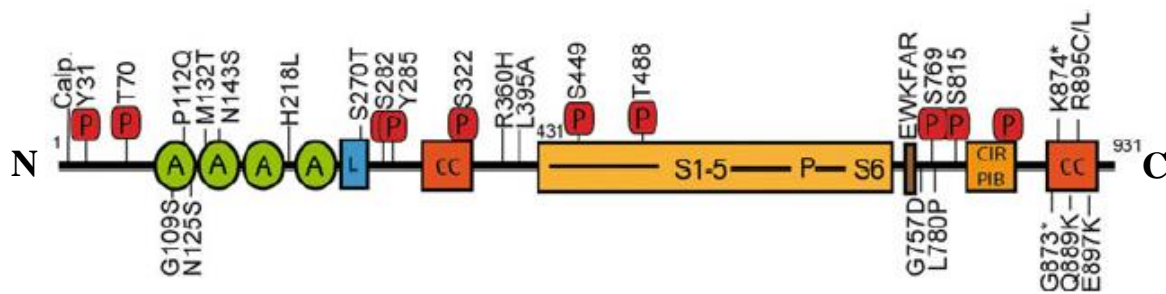
TRPC6 wurde 1997 von Boulay et al. erstmals aus Mäusegehirn kloniert und charakterisiert. Zwei Jahre später wiesen Hofmann et al. TRPC6 erstmals beim Menschen nach. Das Gen für TRPC6

befindet sich auf Chromosom 11q21-q22, umfasst 13 Exons und kodiert für ein 930 Aminosäuren großes Protein (D'Esposito et al., 1998). Bei der Maus findet sich das ebenfalls 13 Exons umfassende Gen auf Chromosom 9A1; das Protein besteht hier aus 931 Aminosäuren und gleicht dem menschlichen Protein in der Zusammensetzung der Aminosäuren zu 93%. In menschlichen glatten Muskelzellen der Atemwege (Corteling et al., 2004) und in der Lungengewebe von Ratten (Zhang und Saffen, 2001) konnten mehrere Splice-Varianten von TRPC6 nachgewiesen werden. Ihre physiologische Funktion ist bisher unklar (Nilius und Owsianik, 2011; Dietrich und Gudermann, 2014).

### **2.3.5.2 Struktur**

TRPC6 hat, wie alle TRP-Proteine, eine angenommene transmembranäre Struktur mit sechs transmembranären Domänen, intrazellulär gelegenen N- und C-Termini und einer porenbildenden „Loop“-Region zwischen S5 und S6 (Abb. 2.5). Im N-terminalen Bereich befinden sich 4 Ankyrin-Repeats, von denen die zweite mit der Dynamin-Unterart MxA interagiert (Lussier et al., 2005), sowie eine „coiled coil“-Domäne. Außerdem konnte eine auch bei TRPC3 vorkommende, OAG-sensitive Domäne gefunden werden, über welche sowohl der Transport der Kanäle zur Zellmembran, als auch deren Bindung an Zellmembran-Lipide vermittelt wird (van Rossum et al., 2008; s. „L“ in Abb. 2.6). Im C-terminalen Bereich befindet sich eine unter den TRP-Kanälen weit verbreitete, konservierte, „TRP-Box“ genannte Abfolge der Aminosäuren „EWKFAR“. Zudem findet sich eine IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Bindungsstelle, welche mit einer Calmodulin-Bindungsstelle und einer Phosphoinositol-Bindungsstelle überlappt, sowie eine weitere coiled-coil-Domäne (Abb. 2.6; Dietrich und Gudermann 2014) Ebenfalls am C-terminalen Ende befindet sich eine unter Calcium-Kanälen weit verbreitete, „EF-Hand“ genannte Helix-Loop-Helix-Struktur mit Calciumionen-Bindestelle (Wu, Sweet und Clapham, 2010).

TRPC6 ist höchst wahrscheinlich, wie auch andere TRP-Kanäle, in Tetrameren organisiert. Dabei scheinen sowohl Homo-, als auch Heteromultimere zu existieren. Letztere werden bevorzugt mit den nah verwandten Kanälen TRPC3 und -7 gebildet (Goel et al., 2002; Hofmann et al., 2002), jedoch wurden auch Heteromultimere mit TRPC1 und -4, bzw. mit TRPC1 und -5 (Strubing et al., 2003), sowie mit TRPC1 allein nachgewiesen (Storch et al., 2012). Dabei geschieht die Organisation vermutlich meist im Rahmen größerer Proteinkomplexe, so genannter „Signalplexe“. Für TRPC6 wurde u.a. ein Multiproteinkomplex mit der Proteinkinase C, FKBP12 („FK506-binding protein-12 Kilo-Dalton“) und Calcineurin/Calmodulin nachgewiesen (Dietrich und Gudermann, 2014).

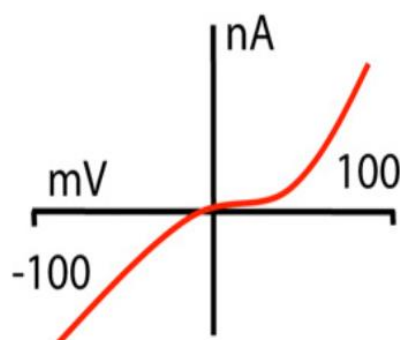


**Abb. 2.6: Domänenstruktur von TRPC6**

A: Ankyrin Repeats, CC: coiled coil-Domäne, CIR/PIB: Calcium-/Calmodulin-/IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Phosphoinositol-Bindungs-Domäne, EWKFAR: TRP-Box, L: DAG-sensitive Membranlipid-Koppelungs- und Zelltransport-vermittelnde Domäne, P: Phosphorylierungsstellen. Von Mutationen betroffene Stellen bei fokal-segmentaler Glomerulosklerose sind entsprechend den bekannten Basenaustauschen gekennzeichnet (z.B. „G109S“; aus: Dietrich und Gudermann, 2014).

### 2.3.5.3 Elektrophysiologische Eigenschaften

In elektrophysiologischen Untersuchungen von TRPC6-Kanälen in heterologen Expressionssystemen stellt sich TRPC6 als ein Calciumionen-permeabler, nonselektiver Kationenkanal mit einem doppelt-gleichrichtenden Strom und einer typischen, umgekehrt S-förmigen Strom-Spannungs-Kurve mit einem Sattel im Bereich um 0 mV dar (Abb. 2.7). Letzterer scheint bedingt zu sein durch einen intrazellulären Magnesium-Block (Obukhov et al., 2005; Estacion et al., 2006). Die Einzelkanal-Leitfähigkeit liegt bei etwa 35 pS. TRPC6 zeigt eine etwa sechs Mal höhere Durchlässigkeit von Calcium- gegenüber Natriumionen (Hofmann et al., 1999). Jedoch scheinen Calciumionen nur ca. 4% des Gesamtstromes im Beisein von Natriumionen auszumachen, wenn TRPC6 in HEK293-Zellen stabil überexprimiert wird (Estacion et al., 2006). Neben einer Calciumionenaufnahme in Zellen wurde kürzlich zudem eine Zinkionenaufnahme durch TRPC6 in HEK 293-Zellen beschrieben (Gibon et al., 2011).



**Abb. 2.7: Typische Strom-Spannungs-Kurve (IV-Curve) von TRPC6 (aus: Wu, Sweet und Clapham, 2010)**

### 2.3.5.4 Aktivierung und Regulation

TRPC6 ist ein Rezeptor-gesteuerter Kanal (ROCC). Eine Beteiligung am Speicher-gesteuerten Calciumeinstrom (SOCE) konnte zunächst nicht nachgewiesen werden (Boulay et al., 1997). So

bewirkte eine Entleerung der intrazellulären Speicher durch Thapsigargin (Hemmer der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasen im Sarco-/Endoplasmatischen Reticulum), wie auch  $\text{IP}_3$  keine Stromzunahme in TRPC6 überexprimierenden Zellen. Hingegen verstärkt der G-Protein-Aktivator  $\text{AlF}_4^-$  Agonist-induzierte TRPC6-Ströme, während der Phospholipase-C-Hemmer U73122 diese hemmt. Somit scheint die Aktivierung des Kanals G-Protein-gesteuert und Phospholipase-C-abhängig zu sein. Darüber hinaus erfolgt eine Aktivierung von TRPC6 durch DAG, und zwar unabhängig von der Proteinkinase C (Hofmann et al., 1999). In kürzlich erschienenen Arbeiten wurde jedoch für Thrombozyten eine Interaktion von TRPC6 mit dem Stromal interacting molecule (STIM) und ORAI und damit eine Beteiligung am SOCE angenommen (Dietrich und Gudermann, 2014).

Durch eine spezifische Glycosylierung des TRPC6-Proteins im Bereich der extrazellulären Loops S1-S2 und S3-S4 ( $\text{Asn}^{473}$  und  $\text{Asn}^{561}$ ) zeigt TRPC6 im Gegensatz zu TRPC3 eine strikt Rezeptor-gesteuerte Funktion, d.h. kaum basale Aktivität (Dietrich et al., 2003). Durch Calciumionen erfolgt eine komplexe Regulierung der Aktivität von TRPC6: extrazelluläre Calciumionen hemmen in höheren Konzentrationen die Aktivität, während niedrigere Konzentrationen die Aktivität erhöhen. Eine komplette Abwesenheit von Calcium- und Natriumionen führt zu einem Verschwinden des Stromes (Jung et al., 2002). Auch intrazellulär findet eine komplexe Regulation durch Calciumionen und Calmodulin statt. Während Calciumionen-Konzentrationen  $< 200 \text{ nM}$  die Aktivität von TRPC6 steigern, wird TRPC6 bei intrazellulären Calciumionen-Konzentrationen  $> 200 \text{ nM}$  gehemmt. Diese beinhaltet, im Gegensatz zu TRPC7, eine Phosphorylierung durch die Calmodulin-abhängige Kinase II (Shi et al., 2004). Erst bei hohen intrazellulären Calciumionen-Konzentrationen scheint Calcium/Calmodulin TRPC6 zu hemmen (Boulay, 2002; Shi et al., 2004). Die TRPC6-Aktivität wird über die am C-terminalen Ende gelegene Calcium-/Calmodulin-/ $\text{IP}_3$ -Receptor-Phosphatidylinositol-Bindungs-Domäne (CIRPIB; s. Abb. 2.3) moduliert, wobei Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat die Aktivität von TRPC6 durch kompetitive Verdrängung von Calmodulin zu steigern scheint (Kwon et al., 2007).

Eine weitere Regulation der TRPC6-Aktivität erfolgt durch spezifische Phosphorylierungen. So hemmt die Proteinkinase C die Aktivierung von TRPC6 (Estacion et al., 2004). Eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C an  $\text{Serin}^{768}$  scheint nicht nur zu einer Hemmung der TRPC6-Aktivierung, sondern auch zu einer Bindung von FKBP12 und Calcineurin/Calmodulin an TRPC6 zu führen. Dies bewirkt eine Ablösung des G-Protein-gekoppelten muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors M1 von einem um TRPC6 gruppierten Multiprotein-Komplex, bestehend aus TRPC6, mAChR M1, Proteinkinase C, FKBP12 und Calcineurin/Calmodulin (Kim und Saffen, 2005). Spätere Untersuchungen führten zu der Vermutung, dass eine Phosphorylierung an  $\text{Serin}^{448}$  stattfindet (Bousquet et al., 2010). Src und Fyn, zwei Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen steigern hingegen



die Aktivität von TRPC6 (Hisatsune et al., 2004). Daneben wird die Aktivität von TRPC6 durch weitere Phosphorylierungen beeinflusst (Dietrich und Gudermann, 2014).

### **2.3.5.5 Pharmakologie**

TRPC6 lässt sich, wie auch TRPC3 und -7 physiologisch durch Stimulation von  $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren (wie z.B. mAChR; Boulay et al., 1997) oder durch extrazelluläre Applikation von OAG (Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999) aktivieren. Als weiterer Aktivator wurde der Arachidonsäuremetabolit 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) entdeckt, wobei jedoch unklar ist, inwieweit 20-HETE spezifisch wirkt und in wie weit er physiologisch relevant ist (Basora et al., 2003, Dietrich und Gudermann, 2007). Flufenamat, ein unspezifischer Kationenkanal-Blocker, zeigte sich als TRPC6-Aktivator in Patch clamp-Untersuchungen an stabil TRPC6-überexprimierenden HEK293-Zellen (Inoue et al., 2001). Auch durch Niflummat ließ sich TRPC6 in Calcium-Imaging- und Patch clamp-Untersuchungen aktivieren (Jung et al., 2002). Zudem wurde Hyperforin, ein Hauptwirkstoff des Johanniskrauts als spezifischer Aktivator von TRPC6 beschrieben (Leuner et al., 2007).

Für TRPC6 existierten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine spezifischen Blocker. Seltene Erden wie  $La^{+++}$  und  $Gd^{+++}$  blockieren TRPC6, wie auch viele andere Ionenkanäle. Daneben existieren weitere unspezifische Ionenkanalblocker, z.B. 2ABP und SKF63365 (Dietrich und Gudermann, 2014).

Neuere Untersuchungen konnten für SAR7334 (Maier et al., 2015) und die Lärchenharzbestandteile Larixol and Larixylacetat (Urban et al., 2016) eine relativ spezifische Hemmung von TRPC6 in vitro zeigen. Norgestimat, ein synthetisches Gestagen hemmt TRPC3 und -6 spezifisch, ebenso, jedoch deutlich schwächer Progesteron (Miehe et al., 2012). Des Weiteren hemmen mehrere Anilothiazolamide spezifisch TRPC3 und -6 (Washburn et al., 2013).

### **2.3.5.6 Expression**

TRPC6 ist ein ubiquitär vorkommender Ionenkanal. Höhere Expressionslevel sind beim Menschen in der Lunge, der Plazenta, den Ovarien, der Milz und im Dünndarm zu finden (Hofmann et al., 1999). TRPC6 wird in Epithelien der Lunge, sowie in Keratinozyten exprimiert. Des Weiteren in Endothelzellen, Herzmuskelzellen und -Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen, sowie den Glomeruli der Nieren. Auch in den glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes wird TRPC6 exprimiert. Zudem wird TRPC6 in Erythrozyten, Thrombozyten und weißen Blutkörperchen exprimiert (Abramowitz und Birnbaumer, 2009; Nelson et al., 2010). Im Gehirn sind die

Expressionslevel für TRPC6 niedriger als die anderer TRP-Kanäle. Bei der Ratte kommt TRPC6 spezifisch im Gyrus dentatus des Hippocampus vor (Bonaventure et al., 2002; Dietrich und Gudermann, 2014), bei Mäusen spezifisch in der Dentata-Granulosazellschicht (Otsuka et al., 1998).

### **2.3.5.7 Physiologie und Pathophysiologie**

Im Herz-Kreislauf-System übernimmt TRPC6 eine Reihe regulatorischer Funktionen, welche im Rahmen von Stressreaktionen eine wichtige Rolle spielen. Der myogene Tonus von Arterien (Welsh et al., 2002; Menderos y Schnitzler et al., 2008) ist, wie auch die hormongesteuerte Vasokonstriktion TRPC6-vermittelt (Inoue et al., 2001; Jung et al., 2002). TRPC6-Knockout-Mäuse haben einen erhöhten Tonus glatter Gefäßmuskelzellen und einen erhöhten Blutdruck. Dies scheint an einer Überexpression von TRPC3, welches normalerweise mit TRPC6 Multimere bildet, und dessen höherer konstitutiver Aktivität zu liegen (Dietrich et al., 2003 und 2005). Weitere Prozesse mit TRPC6-Beteiligung sind die Endothelzellpermeabilität (Singh et al., 2007; Weißmann et al., 2012) und -Migration, letztere mit Beteiligung von TRPC5 (Chaudhuri et al., 2008), des Weiteren die akute hypoxische Vasokonstriktion (Weissmann et al., 2006).

TRPC6 ist ebenfalls an pathophysiologischen Reaktionen des Herz-Kreislauf-Systems beteiligt. So wurde in Versuchen an Tiermodellen zur arteriellen Hypertonie eine erhöhte Expression von TRPC6 nachgewiesen. Des Weiteren steigern Mineralocorticoide die Transkription von TRPC6 in glatten Muskelzellen von Ratten (Bae et al., 2007). Im Rahmen der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie zeigen sich ebenfalls erhöhte Expressionslevel von TRPC6, wobei die gesteigerte Proliferation von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen mit TRPC6 in Verbindung gebracht wird (Yu et al., 2004 und 2009). Bei kardialer Hypertrophie wurde eine erhöhte Expression von TRPC6 nachgewiesen (Kuwahara et al., 2006). Eine Überexpression von TRPC6 führte entsprechend zu einer kardialen Hypertrophie bei Mäusen (Wilkins und Moltenkin, 2004). Auch hier bildet TRPC6 Heteromultimere mit TRPC3 (Onohara et al., 2006). Hingegen hemmen höhere TRPC6-Level die Ausbildung einer kardialen Fibrose (Nishida et al., 2007). Sildenafil, ein Phosphodiesterase-5-Hemmer bewirkt über eine Phosphorylierung von TRPC6 an Threonin<sup>69</sup> eine Hemmung der kardialen Hypertrophie (Nishida et al., 2010).

Im zentralen Nervensystem ist das Wachstum von Dendriten TRPC6-vermittelt (Tai et al., 2008). Des Weiteren ist TRPC6 in die Ausbildung exzitatorischer Synapsen involviert (Zhou et al., 2008). Zudem wurde angenommen, dass Hyperforin, eine antidepressiv wirkende Substanz aus Johanniskrautextrakt über eine Stimulation von TRPC6 mit konsekutivem Natriumeinstrom die Natrium-vermittelte Neurotransmitter-Wiederaufnahme senkt (Leuner et al., 2007). In Experimenten mit Hyperforin an PC12-Zellen zeigte sich ein Neuritenwachstum ähnlich dem nach Stimulation mit

NGF (neurite growth factor; Leuner et al., 2007). Zudem mindert es die akute hypoxische Hirnschädigung (Lin et al., 2013). Im Rahmen des metabolischen Syndroms wurde eine erhöhte Expression von TRPC1, -5 und -6 in chromaffinen Nebennierenzellen von Schweinen nachgewiesen (Hu et al., 2009).

Bei einer Vielzahl weiterer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse wurde eine Beteiligung von TRPC6 nachgewiesen. So ist TRPC6 in den Nieren essentiell für die Funktion der Podozyten der Nierenglomeruli (Reiser et al., 2005). Verschiedene gain-of-function-Mutationen des TRPC6-Gens führen beim Menschen zur so genannten fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) mit Proteinurie und Niereninsuffizienz (Winn et al., 2005). Neuere Untersuchungen zeigen zudem eine verminderte Expression von TRPC6 als mögliche Grundlage für ein reduziertes Ansprechen von glomerulären Mesangiumzellen auf Kontraktionsreize bei Diabetes mellitus (Graham et al., 2007). Ebenfalls führt eine erhöhte Glucoseexposition zu einer Heraufregulierung der TRPC6-Expression in Thrombozyten, einer möglichen Ursache für die bei Diabetes mellitus beobachtete Hyperaktivität der Thrombozyten (Liu et al., 2008). Auch die Migration von Monozyten (Schilling und Eder, 2009) und neutrophilen Granulozyten von Mäusen (Damann et al., 2009) ist wohl TRPC6-reguliert. Des Weiteren scheint TRPC6 zusammen mit TRPC2 in die Regulation der Erythropoetin-Wirkung auf murine Erythroblasten eingebunden zu sein (Chu et al., 2004). Zudem spielt TRPC6 in der Abbaukaskade von Erythrozyten eine Rolle (Foller et al., 2008).

Ein TRPC6-vermittelter pulmonaler Prozess ist die Aktivierung von TRPC6 im Rahmen von Asthma bronchiale (Sel et al., 2008; Damann et al., 2009).

Im Darm ist TRPC6 in der glatten Muskulatur nachweisbar. TRPC4- und -6-Knockout-Mäuse zeigen eine gestörte Darmmotilität (Tsvilovsky et al., 2009).

Bei Patienten mit Psoriasis, einer Erkrankung mit erhöhter Keratinozytenproliferation bei unzureichender Keratinozytendifferenzierung finden sich erniedrigte TRPC6-Level in den Keratinozyten. Eine Stimulation von TRPC6 mittels Hyperforin führt zu einer Differenzierung dieser Zellen (Müller et al., 2008; Leuner et al., 2011). Auch an der im Rahmen der Wundheilung stattfindenden Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten ist TRPC6 beteiligt (Davis et al., 2012).

Das Wachstum von Tumorzellen, z.B. des Prostatakarzinoms steht in Verbindung mit einer veränderten TRPC6-Aktivität (Thebault et al., 2006; Abramowitz und Birnbaumer, 2009; Nelson et al., 2010; Dietrich und Gudermann, 2014).

## 2.4 Ziel der Arbeit

Die Calcium-Signalgebung in chromaffinen Nebennierenzellen ist ein komplexer, ausführlich erforschter, jedoch noch nicht umfassend bekannter Mechanismus. Bisher wurde besonders die Rolle, Verteilung und Regulation der spannungsgesteuerten Calciumkanäle beleuchtet. Welche weiteren Kanäle in chromaffinen Nebennierenzellen eine Rolle spielen, ist noch weitgehend unbekannt. Die Untersuchung chromaffiner Nebennierenzellen ist aus zwei Gründen interessant: Erstens zum Verständnis der Regulation und Modulation der den ganzen Körper betreffenden physiologischen, wie auch pathophysiologischen Stressreaktionen. Zweitens eignen sich chromaffine Nebennierenzellen gut als Modell zur Untersuchung der Signaltransduktionswege erregbarer, insbesondere neuronaler Zellen. In Voruntersuchungen zu meiner Arbeit konnte der Kanal TRPC6 in murinen chromaffinen Nebennierenzellen nachgewiesen werden, nachdem dieser zuvor bereits in der aus immortalisierten chromaffinen Zellen gewonnenen Zelllinie PC12 nachgewiesen werden konnte (Mwanjewe und Grover, 2004; Kim und Saffen, 2005; Zhang et al., 2006). Nach dem Abschluss meiner Experimente veröffentlichte Untersuchungen bestätigen die Existenz von TRPC6 in chromaffinen Zellen von Schweinen (Hu et al., 2009) und Mäusen (Wu et al., 2010). Ziel meiner Arbeit ist die erstmalige funktionelle Untersuchung von TRPC6 in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen mittels fluorimetrischer und elektrophysiologischer Verfahren.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Substanz	Firma
-Alle Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt-	
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Borat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Borosilicatglaskapillaren für Patch-Clamp-Pipetten (Melting Point Capillary)	Kimble Chase, Vineland, New Jersey, USA
Cs-Aspartat	Chemos GmbH, Regenstauf, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
CsCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
CsOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen (jetzt: ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
EGTA (Ethylenglykol-bis(Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
FKS (Fetales Kälber-Serum)	Invitrogen (jetzt: ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
Glucose (D(+)-Glucose-Monohydrat)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Caesar und Koretz, Hilden, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hyperfilm ECL®	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
L-Glutamic Acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried, Deutschland
Methanol	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, Pennsylvania, USA

NaCl	Normapur, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
NaOH	J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, Pennsylvania, USA
Nitrocellulose-Membran	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sigmacote	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TRIS-buffered saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
WhatmanTM#1	Whatman, Maidstone, UK

**Tabelle 3.1: Verbrauchsmaterialien**

### 3.1.2 Reagenzien und Enzyme

Reagenz / Enzym	Firma
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA („bovine serum albumin“, Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Collagenase F	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DNA-Ladder 1 kB	Invitrogen (jetzt: ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fura-2-AM (Fura-2-Acetoxymethylester)	Invitrogen (jetzt: ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
ITS-X (Insulin-Transferrin-Selenium-X-Supplement)	Invitrogen (jetzt: ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
MgATP	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Papain	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Pen / Strep (Penicillin und Streptomycin)	Invitrogen (jetzt: ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit	Invitrogen (jetzt: ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Western Lightning® Western Blot Chemoluminescence Reagent Plus	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA

**Tabelle 3.2: Reagenzien und Enzyme**

### 3.1.3 Agonisten

Agonist	Firma
Carbachol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hyperforin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
OAG (1-Oleyl-2-Acetyl-sn-Glycerol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 3.3: Agonisten

### 3.1.4 Primer und Antikörper

Gen	Primer 1	Primer 2	Erwartete Größe (Basenpaare)
HPRT1	UW 637 58	UW 639 58	310
mTRPC6	PH 653 58/56,7	PH 654 58/56,7	424
Antikörper		Herkunft	
Polyklonaler Anti-TRPC6-Antikörper 861 (Kaninchen)		Prof. Dr. V. Flockerzi, Universität des Saarlandes, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Homburg, Deutschland	
ECL® Anti-rabbit IgG		GE Healthcare, Little Chalfont, UK	

Tabelle 3.4: Plasmide, Primer und Antikörper

### 3.1.5 Lösungen

Zellkultur und -Präparation	
Lösung	Zusammensetzung
DMEM-Medium	25 ml DMEM
	250 µl ITS-X
	100 µl Penicillin / Streptomycin
	FCS 10%
Dissociation solution (Mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt)	80 mM L-glutamic acid
	55 mM NaCl
	6 mM KCl
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM HEPES
	10 mM Glucose

P-Lösung	45 µl Papain 100 U / 100 µl
	7,5 µl BSA 10 mg / 100 µl
	15 µl DTT 10mM
	1,5 ml Dissociation solution
C-Lösung	30 µl Collagenase F 15 U / 100 µl
	7,5 µl BSA 10 mg / 100 µl
	15 µl CaCl <sub>2</sub> 10 mM
	1,5 ml Dissociation solution

**Tabelle 3.5: Lösungen für Zellkultur und -Präparation**

<b>Calcium-Imaging und Elektrophysiologie</b>				
<b>Extrazelluläre Lösungen (Badlösungen):</b>	<b>Calcium-Imaging und Elektrophysiologie (Standardlösungen)</b>		<b>Elektrophysiologie (alternative Lösungen)</b>	
Inhaltsstoffe (mM):	2-Ca <sup>++</sup> - Ringer- Lösung	No-Ca <sup>++</sup> -Ringer- Lösung	2-Ca <sup>++</sup> -Ringer- Lösung mit 10 mM CsCl („10CsCl“)	200 µM Ca <sup>++</sup> -Ringer- Lösung („200µM_Ca_o“)
NaCl	145	145	145	145
KCl	2,8	2,8	2,8	2,8
CaCl <sub>2</sub>	2	-	2	0,2
MgCl <sub>2</sub>	2	2	2	2
HEPES	10	10	10	10
CsCl	-	-	10	-
pH (eingestellt mit:)	7,2 (NaOH)	7,2 (NaOH)	7,2 (NaOH)	7,2 (NaOH)
Die Reagenzien wurden aus einer Stammlösung des jeweiligen Reagenz mit der entsprechenden Badlösung angesetzt				
<b>Intrazelluläre Lösungen:</b>				
<b>Inhaltsstoffe (mM):</b>	Lösung für Patch-Clamp- Untersuchungen an HEK293- Zellen		Lösung für Patch-Clamp-Untersuchungen an chromaffinen Nebennierenzellen (auf 100 nM Ca <sup>++</sup> eingestellte Lösung)	
Cs-Aspartat	145		145	
NaCl	8		8	
MgCl <sub>2</sub>	1		1	
CaCl <sub>2</sub>	-		3,6	
HEPES	10		10	
MgATP	2		2	
EGTA	10		10	
pH (eingestellt mit:)	7,2 (CsOH)		7,2 (CsOH)	

**Tabelle 3.6: Lösungen für Calcium-Imaging und Elektrophysiologie**



<b>Western Blot</b>	
<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
20x PBS	22,8 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	6,8 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	176 g/l NaCl
Tris pH 6,8 für Sammelgel	1M Tris (entspricht 121,4 g/l)
Tris pH 8,8 für Trenngel	1M Tris
10x SDS-Laufpuffer	30,3 g/l Tris
	144,1 g/l Glycin
	10 g/l SDS
2x SDS-Ladepuffer für Proteinextrakte	100 mM Tris pH 6,8
	200 mM DTT (Dithiothreitol)
	20 % Glycerin
	4 % SDS
	0,2 % Bromphenolblau
10xWestern-Transfer-Puffer (WTP)-Stocklösung	144,2 g/l Glycin
	30,3 g/l Tris
Western-Transfer-Puffer	100 ml 10x WTP
	200 ml Methanol
	700 ml destilliertes $\text{H}_2\text{O}$
Blockingpuffer	5 % Magermilchpulver
	1x PBS
APS	10 % APS

**Tabelle 3.7: Lösungen und Puffer für Western Blot**

### 3.1.6 Zellen

<b>Zellart</b>	<b>Herkunft</b>
HEK 293-Zellen (ATCC (American Type Culture Collection), 1573-CRL)	American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA
Stabil TRPC6 überexprimierende HEK 293-Zellen	Ph.D. Michael Zhu, Ohio State University, Columbus, USA, basierend auf HEK 293-Zellen der American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA (Tseng et al., 2004)

**Tabelle 3.8: Zellen**

### 3.1.7 Tiere

Tierart	Stamm
Wildtyp-Mäuse	129 SvJ
TRPC6-Knockout-Mäuse	C6 JN -/- (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Birnbaumer, National Institute of Health Sciences, North Carolina, USA, hergestellt von Dr. A. Dietrich (Dietrich et al., 2005))

Tabelle 3.9: Tiere

### 3.1.8 Geräte

Geräte zur Herstellung der Lösungen		
Gerät	Gerätetyp	Firma
pH-Meter	pH523	WTW, Xylem, White Plants, New York, USA
Osmometer	Osmomat030	Gonotec, Berlin, Deutschland
Zellkultur		
CO <sub>2</sub> -Brutschränke (Water-jacketed Incubators)	Binder C150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
	Labortect 3250	Labortect, Göttingen, Deutschland
Tiefkühlschrank	New Brunswick Scientific U57085	New Brunswick Scientific, Enfield, Connecticut, USA
Reinluftbänke	LaminAir 2448	Heraeus Instruments, Thermo Fisher Scientifics, Waltham, Massachusetts, USA
	Köttermann 8511	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge	Rotanta/K	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Vortexer	Heidolph Reax 200	Heidolph Instruments Kelheim, Deutschland
PCR		
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV-Transilluminator	Herolab E.A.S.Y. B-1228-U5	Herolab Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland

<b>Calcium-Imaging</b>		
Mikroskope	Axiovert 200M und S100 (Objektiv: Fluor 20x/0,75)	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Monochromator	Polychrome V	Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland
<b>Patch-Clamp</b>		
Mikroskop	Axiovert 135M (Objektiv: LDA Achroplan 32x/0,4 Ph)	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Monochromator	Polychrome II	Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland
Patch-Clamp-Verstärker	EPC9	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz, Deutschland
Mikromanipulator	Patch Man	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten-Puller	Narishige PC-10	Narishige, London, U.K.
Labornetzgerät für die Patch-Clamp-Einheit	EA-PS-2016-100	Elektro-Automatik, Viersen, Deutschland
Pneumatische Pumpe	MPCU	Lorenz Messgerätebau, Katlenburg-Lindau, Deutschland

**Tabelle 3.10: Geräte**

### 3.1.9 Computerprogramme

<b>Programm</b>	<b>Firma</b>
Writer	OpenOffice.org, Oracle, Redwood Shores, California, USA
Excel; Word	Microsoft, Redmont, Washington, USA
Igor Pro	WaveMetrics Inc., Portland, Oregon, USA
Pulse, PulseFit	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz, Deutschland
Till Vision	T.I.L.L. Photonics, Gräfelfing, Deutschland
R	R Foundation, Wien, Österreich

**Tabelle 3.11: Programme**

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von HEK 293-Zellen

Als Zellkultur wird die Kultivierung eukaryotischer Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus, also *in vitro*, bezeichnet. Zelllinien sind Zellen einer Gewebeart, die sich im Lauf dieser Zellkultur unbegrenzt fortpflanzen können. Bei der in meiner Arbeit verwendeten Zelllinie *HEK 293* (*human embryonic kidney cells*) handelt es sich um eine seit dem Ende der siebziger Jahre des vorigen Jahrhunderts bestehende, als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffene humane Zelllinie.

Die HEK 293-Zellen wurden in bicarbonatgepuffertem DMEM-Medium im Begasungsbrutschrank bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen kultiviert. Zwei Tage vor der Messung wurden die Zellen einer Kulturflasche in sechs Petrischälchen auf Glascoverslips ausgesät. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und Reinigen mit 2 ml PBS mit Hilfe von 300 µl Trypsinlösung unter Klopfen vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Durch Zugabe von 1700 µl FCS-haltigem DMEM-Medium wurde die Reaktion gestoppt. Sodann wurden die Zellen mit der Pipette auf sechs Petrischälchen mit je 2 ml Medium auf Glascoverslips verteilt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte zur Gewinnung von nativen HEK 293-Zellen (Negativkontrollen) und für die transiente Transfektion mit TRPC6. Die TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen wurden ebenfalls nach o.g. Schema kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 3.2.2 Präparation von chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen

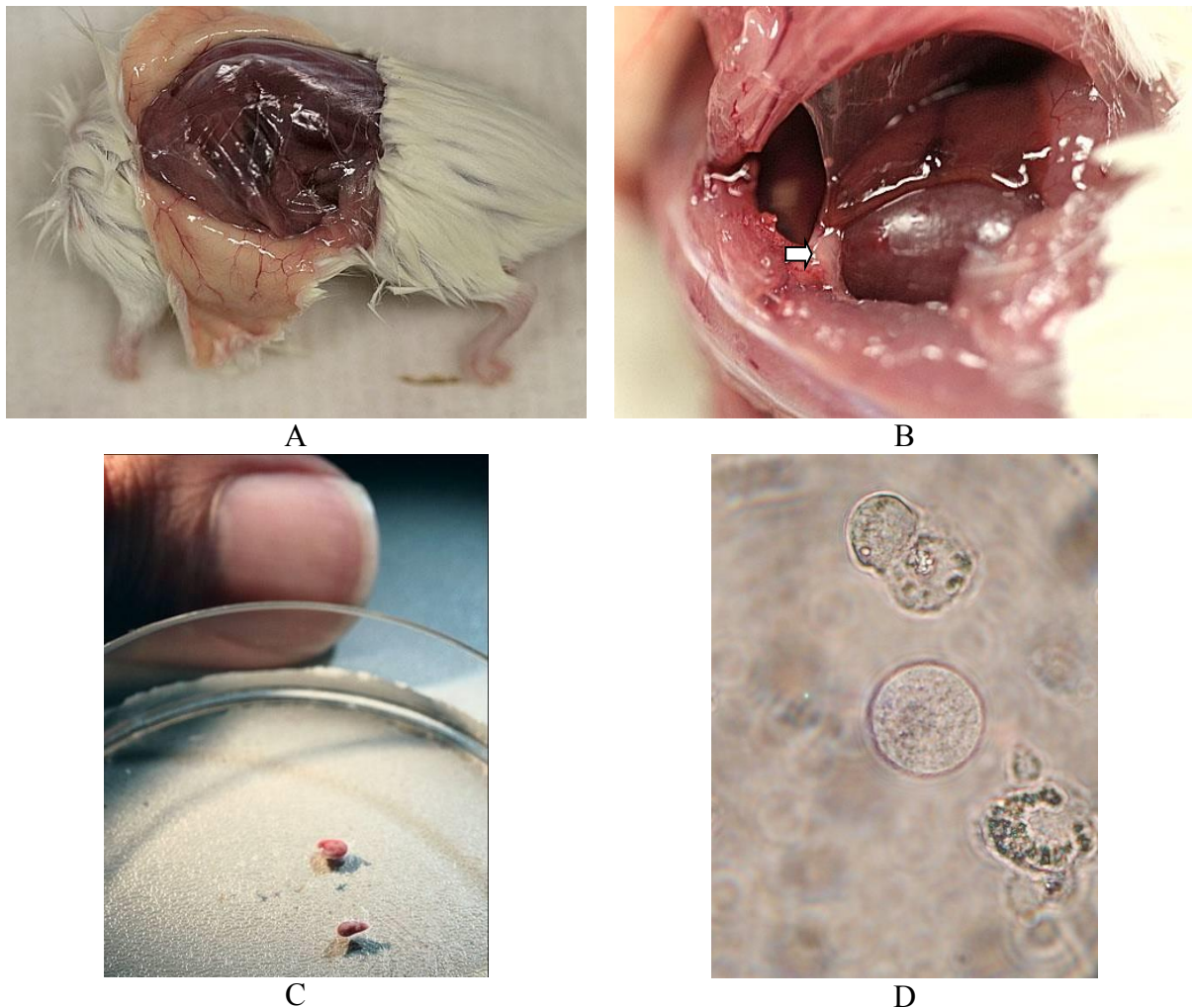
Die Präparation der chromaffinen Zellen aus dem Nebennierenmark von Mäusen erfolgte mit einigen Änderungen in Anlehnung an die Präparation von chromaffinen Zellen aus dem Nebennierenmark von Rindern (Fenwick et al., 1982; Bödding und Penner, 1999). Zur Vorbereitung wurden 25 ml DMEM-Medium angesetzt und im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> auf 37° C erwärmt, zwei feine und eine grobe Pinzette und je eine grobe und feine Schere in einem Gefäß mit Alkohol bereitgestellt, P- und C-Lösung steril filtriert und, ebenso wie 6 sterile Petrischälchen mit je 2 Tropfen Dissociation solution, auf Eis gelagert.

Nach Tötung der Maus durch Begasung mit CO<sub>2</sub> wurde die Maus zur Vermeidung von Verunreinigungen durch Haare mit Alkohol angefeuchtet und sodann dekapitiert. Dann erfolgte die Präparation der linken Nebenniere. Hierzu wurde das Fell unterhalb der Rippen angehoben und mit

einem T-Schnitt entfernt. (Abb. 3.1A) Sodann erfolgte die Freilegung der Nebenniere durch Entfernen der Muskulatur und Eröffnen des Bauchraumes (Abb. 3.1B). Nach der vorsichtigen Entnahme der linken Nebenniere mit Hilfe einer feinen Pinzette und sofortiger Überführung in ein Petrischälchen mit Dissociation solution auf Eis (Abb. 3.1C) erfolgte die Präparation und Lagerung der rechten Nebenniere nach gleichem Muster, wobei allerdings die Nähe zur Leber mit hohem Blutungs- und somit Sichtverlust-Risiko zu beachten war. Unmittelbar nach Exstirpation beider Nebennieren erfolgte die Präparation des Nebennierenmarks unter dem Binokular-Mikroskop. Dazu wurde zuerst das um die Nebenniere befindliche transparente Häutchen vorsichtig entfernt. Sodann erfolgte die Entfernung des Nebennierenrinden-Gewebes mit Hilfe feiner Pinzetten in einem frischen Petrischälchen mit Dissociation solution. Das fertig präparierte Nebennierenmark wurde in einem weiteren Petrischälchen mit Dissociation solution auf Eis zwischengelagert.

Um einzelne chromaffine Nebennierenzellen zu gewinnen, wurde das freipräparierte Nebennierenmark in 1 ml P-Lösung (s. Tab. 3.5) überführt und bei 37 °C 10 Minuten im Wasserbad geschüttelt. Sodann wurde die P- gegen C-Lösung ausgetauscht und das Mark weitere 8 Minuten im Wasserbad geschüttelt. Nach fünfmaliger Vortrituration mit einer Pasteur-Pipette unter der Reinluftbank folgten weitere 5 Minuten im Wasserbad. Dann wurde das Mark in mehreren Stufen mit abgeflammt, immer feineren Pasteur-Pipetten trituriert, bis eine trübe Lösung entstand. Die Lösung wurde abzentrifugiert (1000rpm/4 min/RT), der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde der Vorgang einmal identisch und ein zweites Mal in etwas abgeschwächter Form (700rpm/5 min/RT) wiederholt. Schließlich wurden die Zellen auf 6 sterile Petrischälchen mit Glascoverslips verteilt. Nach einer Ruhephase von ca. 30 Minuten im Brutschrank bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> wurden je 3 ml Medium hinzugegeben. Die chromaffinen Nebennierenzellen waren nach 8 Stunden messbereit und hielten sich ca. 24 Stunden. Sie sind leicht erkennbar durch ihre polygonale bis runde Form und ihre glatte Oberfläche bei einem Durchmesser von etwa 10-20 µm (Abb. 3.1D).

Eine sichere Identifizierung chromaffiner Zellen erfolgte durch Nachweis des Anstiegs der intrazellulären Calciumionenkonzentration unter depolarisierenden Bedingungen (Applikation von 100 mM Kaliumchlorid-haltiger Badlösung) in Calcium-Imaging-Versuchen. Dieser war ausschließlich in chromaffinen Nebennierenzellen, nicht jedoch in anderen in der Präparation enthaltenen Zellen (wahrscheinlich Blutzellen) nachweisbar. In Patch-Clamp-Experimenten konnte zudem eine Aktivierung spannungsabhängiger Kanäle nach Anlegen einer Spannungsrampe von -110 bis 90 mV (Haltepotential -80 mV) nachgewiesen werden.



**Abb. 3.1: Präparation von chromaffinen Zellen aus Nebennieren von Mäusen**

A: Entfernung des Fells mit Hilfe eines T-Schnitts. Nach Eröffnung des Retroperitonealraumes sind Niere und Nebenniere zu erkennen (→; B). C: zwei frisch präparierte Nebennieren in Dissociation solution. Im Vergleich dazu ein Daumennagel. D: Eine chromaffine Zelle, umgeben von Zellresten. Typisch ist die polygonale bis runde Form mit der glatten Oberfläche bei einem Durchmesser von ungefähr 10-20 µm. Bilder freundlicherweise überlassen von Prof. M. Bödding.

### 3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist ein 1985 von Kary Mullis entwickeltes Verfahren zur In-vitro-Amplifikation von DNA (Saiki et al., 1985). Hierfür wird zunächst ein Reaktionsgemisch angesetzt, bestehend aus zu amplifizierender DNA, zwei Primern (Oligonukleotide, die als Startpunkte für die DNA-Polymerase fungieren), Desoxyribonucleosidtriphosphaten als DNA-Bausteinen, Taq-Polymerase (einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*),  $Mg^{++}$ , welches für die Funktion der Polymerase essentiell ist, sowie Puffern zur Herstellung eines geeigneten Milieus. Mit diesem wird die DNA in drei Schritte umfassenden PCR-Zyklen amplifiziert. Im ersten Schritt eines Zyklus wird das Gemisch auf 94° C erhitzt (*Schmelzen*). Dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA aufgebrochen und es entstehen DNA-Einzelstränge. Im zweiten Schritt (*Primer-Hybridisierung*) wird die Temperatur auf 50-60° C abgesenkt. Nun können die Primer an die DNA-Einzelstränge binden.

Im dritten Schritt (*Elongation*) wird die Temperatur auf ca. 70° C angehoben, was die Synthese der neuen DNA-Stränge durch die Taq-Polymerase ermöglicht. Diese Schritte werden 30-50 Mal wiederholt, wobei es zu einer exponentiellen Vermehrung der gewünschten DNA-Abschnitte kommt. Zuletzt wird das Gemisch auf 4° C abgekühlt, so dass keine weiteren Reaktionen mehr folgen.

Das PCR-Produkt kann durch Agarose-Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert werden. Bei diesem Verfahren macht man sich zu Nutze, dass sich kurze DNA-Stücke in einem unter elektrischer Spannung stehendem Agarose-Gel schneller durch die Poren des Gels auf die Anode zubewegen, als große. Die Länge des PCR-Produkts kann durch einen Vergleich mit einer DNA-Ladder („DNA-Leiter“), die DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zur Probe im Gel mitläuft, bestimmt werden. Sichtbar gemacht wird die DNA hierbei durch Ethidiumbromid, welches interkaliert und im UV-Licht leuchtet.

Die reverse Transkription ist ein ursprünglich bei RNA-Viren vorkommender, 1970 sowohl von Howard Temin, als auch von David Baltimore unabhängig voneinander entdeckter Mechanismus, bei dem mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* RNA in DNA übersetzt wird (Baltimore, 1970; Termin und Mizutani, 1970). In der Molekularbiologie macht man sich diese Funktion zu Nutze, um aus RNA von Zellen DNA (sogenannte cDNA) zu generieren, welche dann z.B. mit Hilfe einer PCR amplifiziert werden kann. So kann eine Aussage darüber getroffen werden, welche Gene in welchen Zellen transkribiert und somit genutzt werden.

Unter RT-PCR versteht man eine Kombination aus PCR und vorgeschalteter reverser Transkription.

Die RT-PCR wurde nach folgendem Schema unter sterilen Bedingungen auf Eis durchgeführt:

<b>PCR-Ansatz:</b>	X	µl Template
	25	µl 2x Reaction Mix (One-Step)
	1	µl RT/Platinum Taq (One-Step)
	1,5	µl Primer 1 (10pmol/µl)
	1,5	µl Primer 2 (10pmol/µl)
	21-X	µl DEPC- H <sub>2</sub> O (“ad 50 µl”)

- X µl chromaffine Zellen und (21-X) µl DEPC-H<sub>2</sub>O zu Cups 1-2
- X µl Hirn RNS (2ng/µl) und (21-X) µl DEPC-H<sub>2</sub>O zu Cups 3-4
- 21 µl DEPC-H<sub>2</sub>O zu Cups 5-6
- Durchmischen durch Ansnipsen des Eppendorfgefäßes

1.	Erststrangsynthese (reverse Transkription):	50°C	32 min	
2.	PCR:	94°C	2 min	
		94°C	15 sec	}
		50°C	30 sec	} 15 Zyklen
		70°C	30 sec	}
		94°C	15 sec	}
		50°C	30 sec	} 30 Zyklen
		70°C	30 sec + 2 s/Zyklus	}
		72°C	5 min	
		→ 4°C		

**Tabelle 3.12: PCR-Schema**

Die Gelelektrophorese wurde mit 2%igem Agarose-Gel durchgeführt. Zur Herstellung wurden 1,2 g Agarose in 150 ml 1xTBE-Puffer (*TRIS*, *Borat*, *EDTA*) unter Kochen gelöst, wobei das durch Verdampfung verloren gegangene Wasser ersetzt wurde. Nach Abkühlen im Wasserbad auf 55° C wurden unter Rühren 7,5 µg Ethidiumbromidlösung zur Agaroselösung beigelegt und diese sodann in eine Form gegossen, wobei ein Kamm zur Formung von Applikationskammern in das eine Ende des Gels gesteckt wurde.

Für die Gelelektrophorese wurde eine Elektrophorese-Kammer mit TBE-Puffer gefüllt und das Gel so in dieser platziert, dass sich die Applikationskammern auf Seiten des Minuspols befanden. Nach Befüllen der Applikationskammern mit den zu untersuchenden PCR-Produkten, der DNA-Ladder, sowie Bromphenolblau zur Sichtbarmachung der Banden erfolgte die Applikation von 100 V Spannung für die ersten 2 cm, dann 150 V zur Auftrennung der PCR-Produkte. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Farbbanden 2/3 des Gels durchlaufen hatten. Zur Auswertung und Fotodokumentation erfolgte die Betrachtung in einer UV-Licht-Kammer.

Die murinen chromaffinen Nebennierenzellen wurden wie in 3.2.2 erläutert gewonnen. Als Positivkontrolle diente HPRT1-mRNA. Diese kodiert die *Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyl-Transferase* (HGPRT), ein ubiquitär exprimiertes Enzym des Purinstoffwechsels der Zellen (Heinrich et al., 2014).

### **3.2.4 Western Blot**

Der Western Blot ist eine von George R. Stark (Renart et al., 1979) und W. Neal Burnette (Burnette 1981) 1979 unabhängig voneinander entwickelte Methode zur Übertragung und Sichtbarmachung von zuvor per Gelelektrophorese nach ihrer Ladung oder Größe aufgetrennten Proteinen auf eine Membran. Die Namensgebung erfolgte in Anlehnung an die 1975 von Edwin Southern entwickelte



Southern-Blot-Methode zur Auftrennung und Detektion von DNA-Fragmenten.

Für die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden aus Zellen extrahierte Proteine zunächst mittels Hitzezufuhr denaturiert, mit Hilfe stark reduzierender Substanzen wie z.B. DTT (Dithiothreitol) durch Trennung der Disulfidbrückenbindungen entfaltet und mit dem Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) in Lösung gebracht. Mit Hilfe des stark negativ geladenen SDS, welches mittels hydrophober Wechselwirkungen an Proteine bindet, kann eine Auftrennung der Proteine rein nach Molekulargröße in einer Gelelektrophorese erfolgen. Die hier verwendete SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) erfolgt dabei in zwei Schritten: die Proteine werden in ein grobporiges *Sammelgel* mit neutralem pH gegeben, welches an ein basisches, feinporiges *Trenngel* anschließt. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes sammeln sich die Proteine zunächst auf Grund des pH-Gradienten an der Grenze der Gele, bevor sie dann im Trenngel nach Molekularmasse aufgetrennt werden. Diese geschieht analog der in 3.2.4 beschriebenen Agarose-Gelelektrophorese. Die Porengröße des Gels wird zum einen durch die Gesamtkonzentration an Acrylamiden bestimmt, zum anderen durch die Konzentration des der Quervernetzung der Acrylamid-Polymere dienenden Bisacrylamids, wobei letztere nicht eine lineare, sondern parabelförmige Beziehung mit Vertex bei 5 % aufweist. Die Proteinbanden werden im Anschluss mittels einer senkrecht angelegten Spannung auf eine Trägermembran, hier Nitrozellulose übertragen („geblottet“).

Die Detektion der Proteine kann nun mittels immunologischer Verfahren erfolgen. Hierzu werden zunächst gegen das zu untersuchende Protein gerichtete Antikörper appliziert. Nach Entfernung nicht gebundener Primärantikörper durch Waschung der Membran kann in einem zweiten Schritt die Detektion der an die Proteine gebundenen Primärantikörper durch einen lumineszierenden Anti-IgG-Antikörper erfolgen. In diesem Fall wurden die Proteinbanden mit Hilfe eines mit Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörpers unter Zugabe von Luminol sichtbar gemacht, wobei die Meerrettichperoxidase eine Chemolumineszenz von Luminol ermöglicht.

Die hinsichtlich der TRPC6-Expression zu untersuchenden murinen chromaffinen Nebennierenzellen wurden wie in 3.2.2 erläutert gewonnen. Nach Abzentrifugieren der Zellen und Verwerfen des Überstandes wurde zum Zellpellet je nach Menge 100- 250 µl 2x SDS- Lade- Puffer (s. Tabelle 3.7) hinzugefügt. Nach Resuspension erfolgte die Hitzedenaturierung (10 min. bei 100°C im Heizblock) und das Entfalten der Proteine durch Aufbrechen der Disulfidbrücken mittels DTT. Sodann erfolgte die Scherung der enthaltenen DNA durch Trituration mittels einer Pipette. Nach nochmaliger (10 min., 13000 rpm) wurde das Pellet verworfen. Die nun im Überstand enthaltenen Proteine konnten nun mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden.

Für die SDS-PAGE wird wie oben beschrieben ein zweischichtiges Gel benötigt. Die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Inhaltsstoffe	Sammelgel 5%	Trenngel 8%
1M Tris pH 6,8	0,75 ml	
1M Tris pH 8,8		4,5 ml
30 % Acrylamid	1 ml	3,2 ml
2 % Bisacrylamid	0,4 ml	1,28 ml
10 % SDS	120 µl	240 µl
enthionisiertes Wasser	3,67 ml	2,72 ml
APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

**Tabelle 3.13: Zusammensetzung der Western Blot-Gele**

Die Herstellung der Gele erfolgte durch Gießen der vorbereiteten Mischungen in eine Gelkammer. Diese besteht aus zwei nebeneinander stehenden Glasplatten, welche nach drei Seiten mittels mit 2,5 %iger Agarose befestigter, 1,5 mm hoher Platzhalter abgedichtet sind. Zunächst wurde die Kammer bis 3 cm unter den Rand mit Trenngel gefüllt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) gestartet und mit Hilfe von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1-2-diamin) katalysiert. Um ein Austrocknen des Gels zu verhindern, wurde dieses mit enthionisiertem Wasser bedeckt. Nach Polymerisation des Trenngels und Abtrocknen wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Zur Bildung von Applikationstaschen wurde ein Kamm in das Sammelgel gehängt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer, in die die Gelkammer mit den Taschen nach oben getaucht wurde. Dabei befindet sich die Kathode taschenseitig, die Anode unten. Zunächst wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Nach Ankunft der Proteine im Trenngel wurde die Spannung auf 240 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die erste Bande der Protein-ladder das Ende des Trenngels erreicht hatte.

Das Übertragen (Blotting) der aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgt wiederum mit Hilfe eines elektrischen Feldes ( $2,5\text{mA}/\text{cm}^2$ ; 5 Std.). Dazu wurde die Membran auf das Gel gelegt. Beides wurde mit Western-Transferpuffer-getränkten Filterpapieren bedeckt und so in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer gelegt, dass die Membran anodenseitig platziert war.

Nach Beendigung des Proteintransfers erfolgte eine Behandlung der Membran für 30 Minuten mit Blocking-Puffer, um freie Bindungsstellen der Membran für Proteine zu besetzen und somit eine Bindung der nachfolgend eingesetzten Antikörper nicht ausschließlich an die zu detektierenden Proteine, sondern auch an die Membran zu verhindern. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der

Membran mit dem polyklonalen Anti-TRPC6-Antikörper 861. Die Membranstreifen wurden hierfür zusammen mit den Antikörpern in 2-4ml 5 % iger Magermilchlösung in Klarsichtfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einem Taumler gelagert. Am nächsten Tag erfolgte nach dreimaliger Waschung der Membran für 10 Minuten mit TRIS-buffered saline zur Entfernung nicht gebundener Antikörper die Inkubation mit den sekundären Antikörpern für zwei Stunden, ansonsten analog zur Inkubation mit den primären Antikörpern.

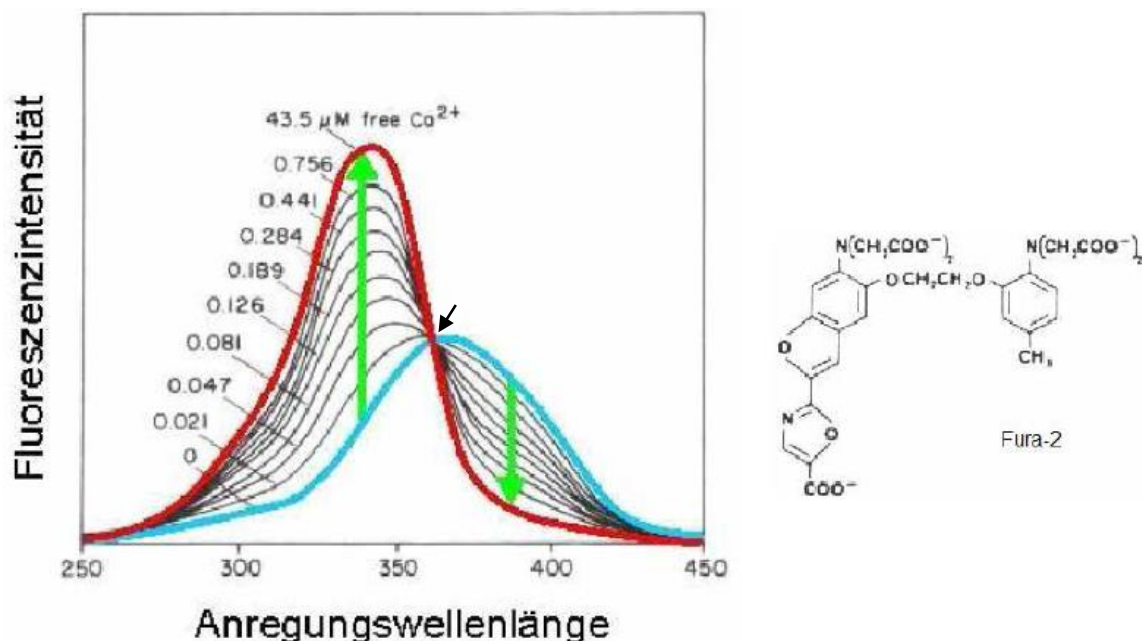
Nach erneut dreimaligem Waschen mit TRIS-buffered saline erfolgte die Detektion mit Hilfe des Western Lightning® Western Blot Chemoluminescence Reagent Plus. Die durch die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase katalysierte Chemolumineszenz konnte nun in einer Autoradiographiekassette auf Film festgehalten werden. Im Anschluss wurde der Film entwickelt, fixiert und getrocknet.

### **3.2.5 Calcium-Imaging**

Unter Calcium-Imaging versteht man die Darstellung und Analyse der Calciumionenkonzentration, sowie deren Veränderung in Zellen und -Organellen. Diese ermöglicht eine Analyse der Aktivität von Plasmamembran-Ionenkanälen, wie auch intrazellulären Prozessen. Hierfür essentiell sind fluoreszierende Chelatoren wie das 1985 von Grzegorz Grynkiewicz synthetisierte Fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985). Fura-2 ist eine organische Säure und als Salz gut wasserlöslich, jedoch auf Grund seiner Carboxygruppen geladen und somit nicht zellgängig. Um eine Diffusion von Fura-2 in Zellen zu erreichen, nutzt man Fura-2-AM, ein Acetoxymethylester-Derivat von Fura-2. Bei Fura-2-AM sind die Carboxygruppen verestert, so dass es neutral und somit zellgängig ist. Intrazellulär vorkommende Esterasen spalten die Esterbindungen, so dass aus Fura-2-AM Fura-2 entsteht. Dieses reichert sich in den Zellen an, da es auf Grund seiner Ladung nicht mehr herausdiffundieren kann (Tsien et al., 1981). Die Dissoziationskonstante von Fura-2 für Calciumionen liegt bei 224 nM. Dank dieser hohen Calciumionen-Affinität ist Fura-2 besonders zur Detektion intrazellulärer Calciumionen -Konzentrationen geeignet.

Nicht allein die hohe Affinität zu Calciumionen, auch sein spezielles Fluoreszenzverhalten macht Fura-2 zu einem für die Untersuchung intrazellulärer Calciumionen-Konzentrationen besonders geeigneten Fluoreszenzfarbstoff. Während die Emissionswellenlänge (510 nm) bei Calciumionen-Konzentrationsänderungen konstant bleibt, verschiebt sich die Anregungswellenlänge mit steigender Calciumionen-Konzentration von 380 zu 340 nm. Allein am isosbestischen Punkt (360 nm) ist die Fluoreszenz unabhängig von der Calciumionen-Konzentration (Abb. 3.2). Dieses Fluoreszenzverhalten erlaubt eine ansonsten auf Grund diverser Faktoren (u.a. unterschiedliche Zelldicke, Fura-2-Konzentration) schwierige Ermittlung der Calciumionen-Konzentration: Detektiert

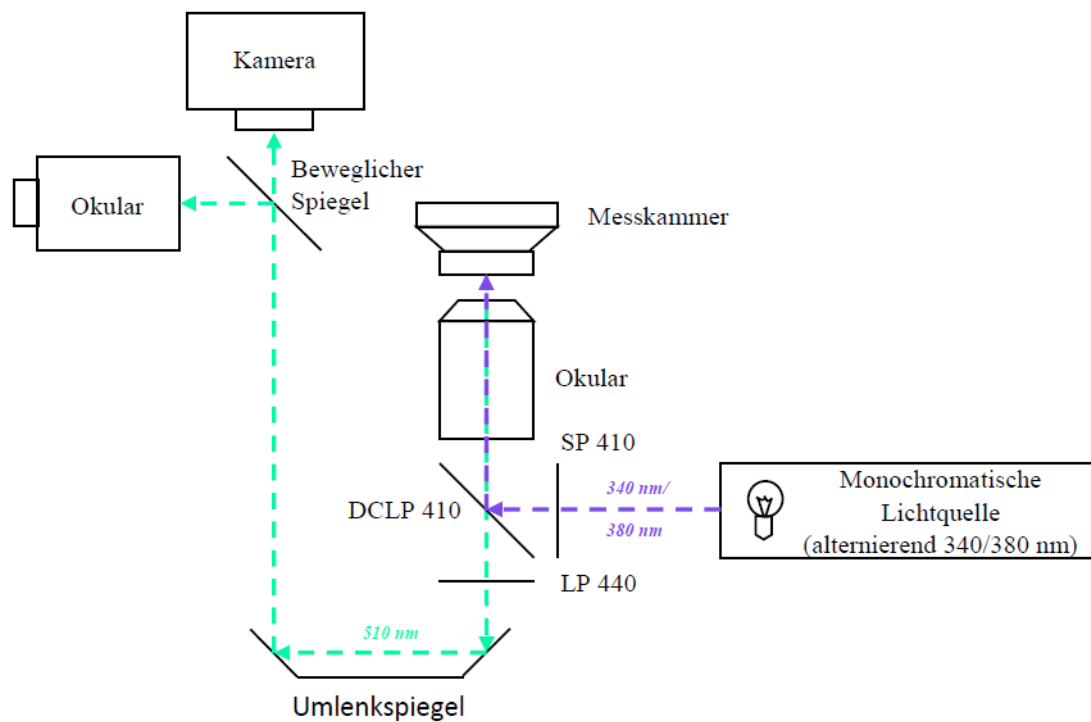
man schnell hintereinander die Fluoreszenz bei Anregungswellenlänge 340 und 380 nm, so kann man annehmen, dass sich in dieser Zeit weder die Fura-2-Konzentration, noch die Zelldicke oder die optischen Eigenschaften der Messapparatur ändern. Bildet man nun aus beiden Messwerten einen Quotienten ( $R$ , engl. *Ratio*), lassen sich diese unbekannten Parameter problemlos wegkürzen. Übrig bleibt ein sich aus  $R = F_{340}/F_{380}$  ergebender, nur von der Calciumionen-Konzentration abhängiger Wert, aus dem sich bei Bedarf mittels Kalibration ein absoluter, quantitativer Wert ableiten lässt, welcher ansonsten aber auch als relativer, qualitativer Wert (A.U., engl. *arbitrary units*) übernommen werden kann.



**Abb. 3.2: Emissionsspektrum und Strukturformel von Fura-2**

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei einer Detektionswellenlänge von 510 nm, einem Anregungsspektrum von 250-450 nm und unterschiedlichen  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentrationen. Deutlich ist die Eigenschaft von Fura-2 zu erkennen, bei steigenden Calciumionen-Konzentrationen mit einem Abfall der Fluoreszenz bei 380 nm und einer Zunahme der Fluoreszenz bei 340 nm zu reagieren (grüne Pfeile). Allein am isosbestischen Punkt ( $\rightarrow$ ) bei 360 nm ist die Fluoreszenz unabhängig von der Calciumionen-Konzentration. Fura-2 bindet Calciumionen mit Hilfe der Carboxylgruppen. Die Stilben-Gruppe ist der Chromophor des Moleküls.

Der Calcium-Imaging-Messplatz (s. Abb. 3.3) besteht aus einem inversen Mikroskop (unten befindliches Objektiv) und einem daran angeschlossenen Imaging-System. Dieses besteht aus einer monochromatischen Lichtquelle zur Anregung von Fura-2, welche alternierend Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm emittiert, einen Filterwürfel, bestehend aus einem *short pass excitation filter* (Anregungslicht-Filter, hier SP 410), einem *dichroic longpass*-Spiegel, welcher das Anregungslicht zu den Zellen weiterleitet, das emittierte Fluoreszenzlicht hingegen zur optischen Einheit durchlässt (hier DCLP 410) und einem *long pass emission filter* (emittiertes Licht-Filter, hier LP 440), einer in letzteren Strahlengang eingebrachten optischen Einheit mit einem Okular und einer Kamera zur Detektion der Fluoreszenzsignale, sowie einem computergestützten Auswertungssystem.



**Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Strahlenganges am Calcium-Imaging-Messplatz**

Calcium-Imaging-Versuche wurden sowohl an HEK-293-Zellen und hTRPC6 überexprimierenden HEK-293-Zellen, als auch an chromaffinen Nebennierenzellen von Wildtyp-Mäusen (129 SvJ) nach folgendem Schema durchgeführt:

30 Minuten vor Beginn der Messungen wurden die Zellen mit 2,5  $\mu\text{M}$  Fura-2-AM inkubiert. Unmittelbar vor der Messung wurde das mit Zellen besäte Deckgläschen in die Messkammer eingespannt. Sodann wurden das Medium, sowie überschüssiges Fura-2 durch dreimaliges Spülen mit Badlösung (2- $\text{Ca}^{++}$ -Ringer-/bzw. no- $\text{Ca}^{++}$ -Ringer-Lösung) entfernt. Schließlich wurde die Messkammer mit 300  $\mu\text{l}$  Badlösung gefüllt. Nach dem Fokussieren folgte die Festlegung der so genannten ROI's (regions of interest) am Rechner, Bereichen im aufgenommenen Bildfeld (hier jeweils einzelne Zellen), welche bezüglich ihres Fluoreszenzverhaltens analysiert werden sollten.

Die Messung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: exposure time: 10 ms, cycle time: 1000 ms, number of cycles: 1000. D.h., jede Sekunde erfolgte die Anregung zuerst mit Licht der Wellenlänge 340 nm, dann 380 nm für jeweils 10 ms bei kontinuierlicher Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität als Antwort darauf bei 510 nm. Das Fluoreszenzverhältnis  $R = F_{340}/F_{380}$  wurde gegen die Zeit aufgetragen. Bei Sekunde 100 erfolgte die Applikation von 300  $\mu\text{l}$  200  $\mu\text{M}$  OAG-Lösung (effektive Konzentration in der Badlösung also 100  $\mu\text{M}$ ), bei Sekunde 800 die Applikation von 600  $\mu\text{l}$  1mM Carbachol-Lösung (effektive Konzentration also 500  $\mu\text{M}$ ).

### 3.2.6 Elektrophysiologie

Die Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981; Neher und Sakmann, 1992; Hille 1992) ist eine Methode, mit der man Ionenkanäle in Zellmembranen funktionell untersuchen kann. Mit ihr ist es möglich, an biologischen Membranen Ströme im Bereich von wenigen Pikoampere ( $10^{-12}$  Ampere) zu registrieren. Die Bezeichnung *Patch* bezieht sich auf den kleinen Membranausschnitt (engl. *patch*: Flicken) unter der gläsernen, fein ausgezogenen Patch-Clamp-Pipette, in welcher eine Messelektrode enthalten ist. Die Bezeichnung *Clamp* beschreibt den Umstand, dass der Membranpatch während der Messung auf einem vorgegebenem Potential gehalten wird (engl. *to clamp*: befestigen, festklemmen; s.u.). Die Methode wurde in den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt (Neher und Sakmann, 1976). Um solch hochauflösende Messergebnisse erhalten zu können, isolierten sie kleine Membranflecken durch das behutsame Aufsetzen einer dünnen Glaspipette. Durch Zufall entdeckte Neher, dass sich durch Ansaugen der Zellmembran an die Pipette der Abdichtwiderstand sprunghaft bis in den Gigaohmbereich ( $10^9 \Omega$ ) steigern lässt (Hamill et al., 1981). Dabei ist bis heute ungeklärt, wie dieser *Gigaseal* genannte Widerstand zustande kommt. Schließlich konnten sie an einem denervierten Froschmuskel Einzelkanalströme durch den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) aufzeichnen. Die rechteckigen Signale mit gleicher Amplitude, aber unterschiedlicher Dauer bestätigten ältere Hypothesen, nach denen Ionenkanäle nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip öffnen und schließen.

Das Prinzip der Spannungsklemme (*Voltage Clamp*) wurde in den dreißiger Jahren des vorigen Jahrhunderts von Kenneth S. Cole und Howard J. Curtis entwickelt (Cole und Curtis, 1940). Bei dieser Methode wird mit Hilfe zweier Elektroden der Membranstrom einer Zelle gemessen. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus wird ein Kompensationsstrom an die Membran abgegeben, sobald sich Ströme über die Membran entwickeln. Dieser bewirkt, dass das Membranpotenzial auf einem zuvor festgelegten Wert fixiert bleibt. Zugleich zeigt er den aktuell über die Membran fließenden Strom an. In der heutigen, weiterentwickelten Form, welche bei meinen Messungen Anwendung fand, werden beide Aufgaben von ein und derselben Elektrode übernommen, welche sich im Lumen der Patch-Clamp-Pipette befindet. Mit dieser Methode ist es möglich, die Aktivierung von Strömen durch einzelne Kanäle über die Zellmembran bei festgelegtem Membranpotenzial zu beobachten (Cole, 1979).

Bei der Patch-Clamp-Technik unterscheidet man unterschiedliche Messkonfigurationen. Allen gemein ist der Ausgangspunkt: Eine Patch-Clamp-Pipette wird behutsam auf die Zellmembran aufgelegt. Sodann erfolgt die Ausbildung des Gigaseals durch vorsichtiges Ansaugen der Zelle. Der so erreichte Zustand wird als *Cell attached*-Modus bezeichnet. Durch einen weiteren, kräftigen Saugstoß oder einen Spannungspuls (0,5-1 V für 0,5-1 ms) kann nun die Membran unter der

Pipettenspitze so aufgebrochen werden, dass die Zelle sich in die Pipette hinein öffnet. Diese als *Whole cell* bezeichnete Messkonfiguration ermöglicht die Messung des Stroms über die gesamte Zellmembran (Ganzzellstrom). Sie eignet sich u.a., um das Verhalten von Zellen unter Stimulation zu untersuchen. Eine weitere Konfiguration ist der *Outside-out-patch*. Man erhält ihn, wenn man durch Wegziehen der Pipette im Whole-cell-Modus einen Membranfleck aus der Zellmembran ausreißt. Dieser verschließt sich wieder, so dass die Außenseite der Zellmembran nach außen zeigt. Die *Inside-out*-Konfiguration wird erreicht durch abruptes Wegziehen der Pipette im Cell-attached-Modus und folgende Exposition des so entstandenen Membranbläschens mit Luft oder  $\text{Ca}^{++}$ -armer Lösung, was bewirkt, dass sich die Membran nicht wieder schließt, so dass die Innenseite der Membran nun frei zugänglich ist (s. Abb. 3.4). Während sich die Outside-out-Konfiguration zur Untersuchung isolierter Kanäle und deren extrazelluläre Modifikation eignet, eignet sich die Inside-out-Konfiguration zur isolierten Untersuchung/Modifikation intrazellulärer Regulationsprozesse.

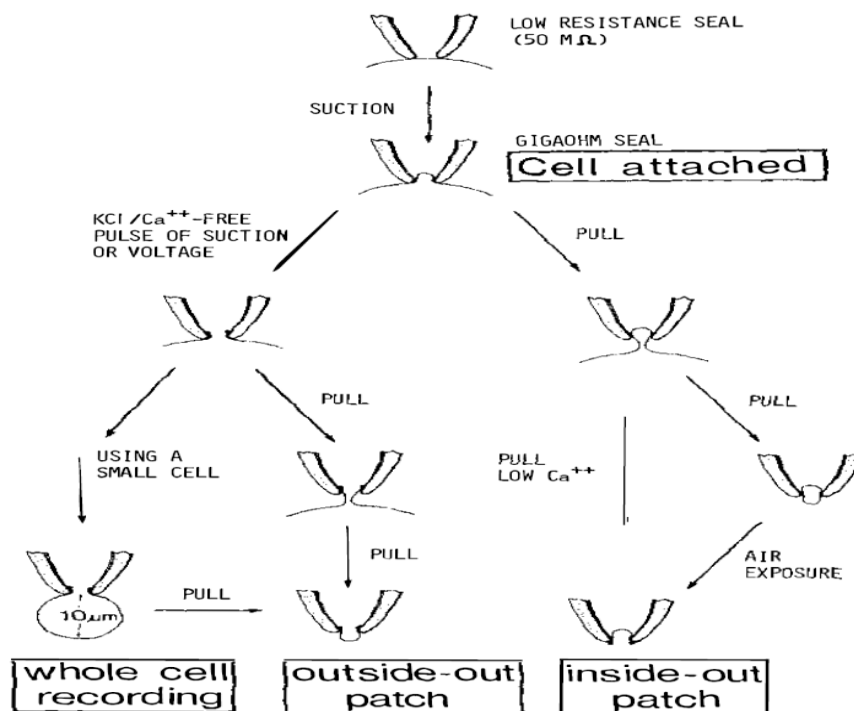


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Messkonfigurationen (aus: Hamill et al., 1981)

Zur Durchführung der Patch-Clamp-Experimente wird ein aus mechanischen, optischen und elektronischen Bauteilen bestehender Messplatz benötigt. Es ist wichtig, den Messplatz vor Erschütterungen bestmöglich zu schützen, da schon kleinste Schwingungen die Messungen erheblich stören und bis zu einem Abreißen der Zelle von der Messpipette führen können. Zu diesem Zweck hat der Messplatz eine schwere Tischplatte, welche z.B. auf Styropor gelagert ist. Um 50-Hertz-Störsignale („Brummen“) elektrischer Geräte fernzuhalten, wird der Messplatz von einem nach vorne hin offenen Faraday-Käfig umgeben. Die Detektion der Zellen erfolgt über ein inverses Mikroskop.

Eine mit dem Mikroskop verbundene Videokamera ermöglicht die Beobachtung der Zelle auch während der Messung. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wird die Patch-Clamp-Pipette präzise und vorsichtig auf die zu messende Zelle aufgesetzt. Über einen am Pipettenhalter angebrachten Schlauch wird die Zelle mittels Saugstoß angesaugt und aufgebrochen. Mit Hilfe eines weiteren Mikromanipulators wird eine Pipette mit größerer Öffnung neben der Zelle platziert. Diese ist an eine pneumatische Pumpe zur Applikation von Reagenzien angeschlossen. Die Messpipetten werden in einem Pipetten-Puller (PC-10) in zwei Schritten aus Borosilikatglas-Kapillaren gezogen.

Bei den Elektroden handelt es sich um Ag/AgCl-Elektroden; Chlorid dient als Ladungsträger. Während die Referenzelektrode in die Badlösung eingetaucht ist, befindet sich die Messelektrode in der mit intrazellulärer Lösung gefüllten Patch-Clamp-Pipette. Sie ist direkt über einen Teflon-isolierten BNC-Stecker mit dem Vorverstärker (s.u.) verbunden. Zur Applikation von Spannungsänderungen an die Zellmembran dient ein Pulsgenerator, dessen digitale Signale in einem D/A-(Digital/Analog-) Wandler in Spannungssignale umgewandelt werden. Der Ableitung der Ströme dienen zwei Verstärker: ein Vorverstärker, der verhindert, dass die winzigen gemessenen Ströme auf dem Weg zum Hauptverstärker im Hintergrundrauschen untergehen, und ein Hauptverstärker (EPC9). In diesem erfolgt die Amplifikation und Filterung des Messsignals. Anschließend wird das Messsignal mit Hilfe eines A/D-Wandlers in einen Rechner eingespeist.

Patch-Clamp-Messungen im whole-cell-Modus wurden sowohl an HEK 293-Zellen, als auch an hTRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen durchgeführt. Dazu wurde das Medium der auf Deckgläschen ausgesäten Zellen nach dreimaligem vorsichtigem Spülen durch extrazelluläre Lösung ersetzt. Aus den nun messbereiten Zellen wurde eine einzelne Zelle zur Messung ausgewählt. Sodann wurde eine frische Patch-Clamp-Pipette mit intrazellulärer Lösung gefüllt, wobei die Spitze durch Eintauchen in die Lösung (Kapillarkräfte), der Rest durch Befüllen mit einer Microloader-Pipette befüllt wurde. Durch Reiben des Pipettenschaftes an einer rauen Pinzette wurden vorhandene Luftblasen entfernt. Zur Verbesserung der kapazitiven Oberflächeneigenschaften der Pipette wurde diese in Sigmacote, eine Silikonlösung getaucht. Nach dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurde der Pipettenwiderstand gemessen, ein Maß für die Öffnungsgröße der Spitze. Er betrug zwischen 3 und 6 MΩ. Es folgte das Annähern der Pipette an die Zelle. Nach dem Ansaugen der Zelle, Kompensation der schnellen Transienten (kapazitative Ströme an der Kapillare) und Ausbildung des Gigaseals wurde der whole-cell-Modus durch Aufbrechen der Zelle mittels eines kräftigen, kurzen Saugstoßes hergestellt. Nach Kompensation der langsamen Transienten (kapazitative Ströme der Zellmembran) wurde die Messung nach folgendem Protokoll gestartet:

- Haltepotential: 0 mV
- Spannungsrampen: alle zwei Sekunden von -100 mV bis +100 mV in 50 ms



Nach einem Vorlauf von stets 30 Rampen (60 s) erfolgte in den Voruntersuchungen die Applikation der Reagenzien für eine Dauer von zunächst pauschal 180 Rampen (360 s) bei einer Gesamtmessdauer von 235 Rampen (470 s). Im weiteren Verlauf wurden Applikations- und Gesamtmessdauer den Reaktionen auf die einzelnen Reagenzien angepasst:

Reagens	Applikationsdauer	Gesamtmessdauer
Carbachol	70 Rampen (140 s)	200 Rampen (400 s)
OAG	150 Rampen (300 s)	300 Rampen (600 s)
Hyperforin	70 Rampen (140 s)	400 Rampen (800 s)

**Tabelle 3.14: Applikationsschemata Elektrophysiologie**

Die Patch-Clamp-Messungen an chromaffinen Nebennierenzellen von Wildtypmäusen (129 SvJ) wurden ebenfalls im whole-cell-Modus durchgeführt (s. Abb. 3.5). Das Vorgehen entsprach weitestgehend dem bei HEK 293-Zellen, lediglich das Haltepotential wurde mit -80 mV niedriger gewählt, um eine erregbaren Zellen entsprechende, möglichst physiologische Ausgangssituation der Messungen herzustellen. Zudem wurde der Beobachtungszeitraum bei Carbachol-Applikation von 200 auf 300 Rampen (600 s) verlängert, um das Zellverhalten noch genauer studieren zu können.



**Abb. 3.5: Chromaffine Nebennierenzelle im whole-cell-Modus.**

Die Abbildung veranschaulicht den engen Kontakt zwischen einer chromaffinen Nebennierenzelle einer Maus und der Patch-Clamp-Pipette im whole-cell-Modus. Links im Bild befindet sich eine Pipette zur Applikation von Reagenzien.

### 3.2.7 Auswertung und Statistik

Die Arbeit wurde mit Hilfe der Textverarbeitungsprogramme OpenOffice.org Writer und Microsoft Word geschrieben. Als Steuerprogramm für die Calcium-Imaging-Versuche diente das Programm TILL Vision. Die Auswertung der Calcium-Imaging-Versuche erfolgte mit Hilfe der Programme Igor Pro und Microsoft Excel. Für die statistische Auswertung wurden jeweils die Mittelwerte des letzten Messwertes vor Applikation, sowie des Maximalwertes nach Applikation verglichen. Kam es zu keiner Reaktion, erfolgte der Vergleich zum Zeitpunkt des Maximalwertes der Vergleichsgruppe (s. Verhalten nach OAG-Applikation in calciumhaltiger vs. calciumfreier Badlösung).

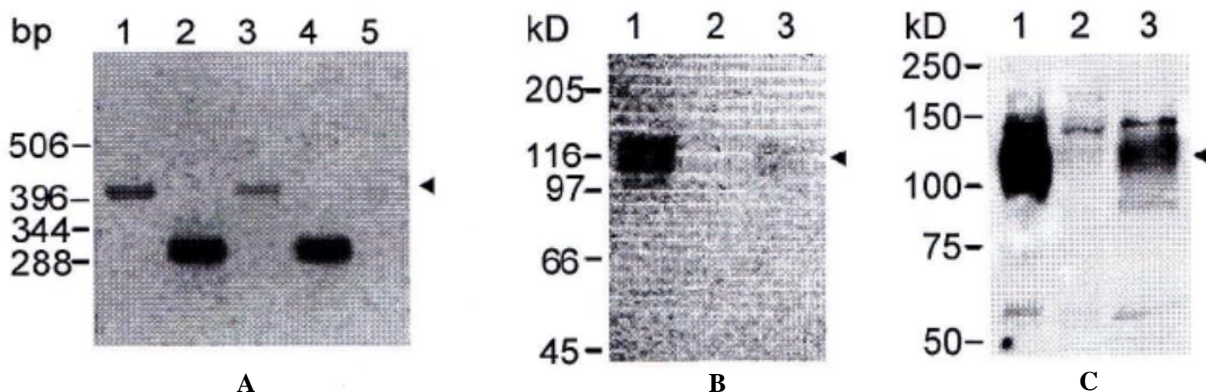
Die Auswertung der Patch-Clamp-Versuche erfolgte mit Hilfe der Programme HEKA Pulse und HEKA PulseFit, sowie Igor Pro. Die Analyse der Ströme erfolgte bei -80 mV (Einwärtsstrom) und +80 mV (Auswärtsstrom) nach Abzug des Liquid Junction-Potentials. Dieses betrug 10 mV. Zusätzlich erfolgte bei den Untersuchungen an chromaffinen Nebennierenzellen eine Darstellung der Stromdichte im Bereich der Spitze der „U-Kurve“, welche die Aktivität der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumionenkanäle widerspiegelt, um Effekte der Reagenzien auf diese Ionenkanäle zu untersuchen („Ipeak“). Zur Veranschaulichung der gemessenen Ströme erfolgte die Darstellung repräsentativer Strom-Spannungs-Kennlinien („IV-Curves“) in Ruhe (eine Rampe, d.h. zwei Sekunden vor Applikation) und unter Stimulation (Maximalstrom). Zur korrekten Darstellung der Strom-Spannungsbeziehungen erfolgte auch hier ein Abzug des Liquid Junction-Potentials (somit -110 bis +90 mV). Die statistische Auswertung erfolgte wie bei den Calcium-Imaging-Versuchen: es wurden jeweils die Mittelwerte des letzten Messwertes vor Applikation, sowie des Maximalwertes nach Applikation, bzw. der Fluoreszenz-Ratios verschiedener Versuchsreihen nach Applikation verglichen. Kam es zu keiner Reaktion, erfolgte der Vergleich zum Zeitpunkt des Maximalwertes der Vergleichsgruppe (s. Verhalten nach OAG-Applikation bei stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen vs. chromaffinen Nebennierenzellen).

Die statistische Analyse der Werte erfolgte durch Bildung der Mittelwerte mit beidseitigem Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) aus der Anzahl (n) der gemessenen Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms R durch Anwendung des gepaarten bzw. ungepaarten t-Tests, bzw. bei nicht gegebener Normalverteilung durch den Wilcoxon-Rangsummentest bzw. den Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test mit dem Signifikanzniveau n.s. = nicht signifikant, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$  und \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Signifikante Änderungen sind durch Sterne gekennzeichnet oder im Text erwähnt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis von TRPC6-mRNA und TRPC6-Proteinen in chromaffinen Nebennierenzellen der Maus

In Voruntersuchungen dieser Arbeit wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Flockerzi, Institut für Pharmakologie und Toxikologie Homburg, molekularbiologische Untersuchungen an chromaffinen Nebennierenzellen von Wildtyp-Mäusen des Stammes 129SvJ durchgeführt. Um nachzuweisen, ob chromaffine Nebennierenzellen von Mäusen TRPC6 exprimieren, wurde die mRNA dieser Zellen mittels RT-PCR untersucht. Hierzu habe ich ebenfalls Messungen durchgeführt. Zudem wurde die Proteinfraktion dieser Zellen mittels Western-Blot untersucht. Es wurde sowohl TRPC6-cDNA (Abb. 4.1A), als auch TRPC6-Protein in murinen chromaffinen Nebennierenzellen nachgewiesen (Abb. 4.1B). Dies bedeutet, dass TRPC6 in chromaffinen Nebennierenzellen der Maus exprimiert wird. Zudem wurde mittels Western-Blot nachgewiesen, dass TRPC6 in den für die Kontroll-Messungen verwendeten untransfizierten HEK 293-Zellen, wie auch in den Zellen TRPC6-defizienter Mäuse nicht exprimiert wird (Abb. 4.1 B, C).



**Abb. 4.1: Nachweis der cDNA von TRPC6 in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen, sowie Nachweis von TRPC6-Proteinen in chromaffinen Nebennierenzellen von Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in untransfizierten HEK 293-Zellen und bei TRPC6-defizienten Mäusen.**

A: TRPC6-cDNA (bei 424 bp, siehe Pfeil) aus chromaffinen Nebennierenzellen (Spur 1) und Gehirn (Spur 3) einer Wildtyp-Maus. Als Positiv-Kontrolle diente ein 310 bp großes Fragment des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase Typ 1 (HPRT-1) aus chromaffinen Nebennierenzellen (Spur 2) und Gehirn (Spur 4). Als Negativ-Kontrolle diente der bei der Präparation der chromaffinen Nebennierenzellen verwendete, Zell-, bzw. Poly-A<sup>+</sup>-RNA-freie Phosphatpuffer (Spur 5). 2%iges Agarose-Gel. (B) Western-Blot mit mikrosomalen Protein-Fractionen aus dem Nebennierenmark (Spur 1) und Gehirn (Spur 3; jeweils 50 µg) von Wildtyp-Mäusen, sowie Lysat aus untransfizierten HEK293-Zellen (Spur 2, 5 µg). Der polyklonale TRPC6-Antikörper 861 detektiert TRPC6 sowohl in der Proteinfraktion aus Zellen des Nebennierenmarks, als auch des Gehirns, nicht jedoch in den HEK 293-Zellen. (C) Western-Blot mit mikrosomalen Protein-Fractionen aus der Lunge von Wildtyp- (Spur 1) und TRPC6-defizienten Mäusen (Spur 2), sowie aus der kompletten Nebenniere von Wildtyp-Mäusen (Spur 3; jeweils 150 µg). Der polyklonale TRPC6-Antikörper 861 detektiert TRPC6 sowohl in der Proteinfraktion aus Zellen der Lunge, als auch der Nebenniere von Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in den Zellen TRPC6-defizienter Mäuse. Daten freundlicherweise überlassen von Prof. M. Bödding.

## 4.2 Calcium-Imaging

Nachdem in den Vorversuchen nachgewiesen wurde, dass chromaffine Nebennierenzellen von Wildtyp-Mäusen (Stamm 129SvJ) TRPC6 exprimiert wird, sollte in den folgenden Experimenten TRPC6 funktionell charakterisiert werden. Führt eine Aktivierung von TRPC6 zu einer Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration chromaffiner Nebennierenzellen der Maus? Die Antwort auf diese Frage wäre ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von TRPC6 an der Ausschüttung von Katecholaminen. Es wurden Calcium-Imaging-Versuche nach folgendem Schema durchgeführt:

- Nach 100 Sekunden erfolgte die Applikation von OAG (1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol), der membrangängigen Form des *Second Messengers* DAG in einer effektiven Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Dies führt zu einer deutlichen Aktivierung von TRPC6-Kanälen (Hofmann et al., 1999).
- Nach insgesamt 800 Sekunden erfolgte die Applikation von Carbachol in einer effektiven Konzentration von 500  $\mu\text{M}$ . Carbachol ist der physiologische Botenstoff der sympathischen Aktivierung chromaffiner Nebennierenzellen (Huppelsberg und Walter, 2005; Garcia et al., 2006). Die Aktivierung von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren mit nachfolgender Produktion von DAG stellt zudem einen möglichen physiologischen Aktivierungsweg von TRPC6 dar (Boulay et al., 1997; Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999). Die Applikation erfolgte mit dem Ziel, zu überprüfen, inwieweit die untersuchten Zellen generell vital und reaktionsfähig waren. Zellen, welche nicht auf Carbachol reagierten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da sowohl HEK 293-, als auch chromaffine Nebennierenzellen muskarinerge Acetylcholinrezeptoren exprimieren, welche mittels  $\text{IP}_3$  eine Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Reticulum bewirken (Huppelsberg und Walter, 2005; Garcia et al., 2006; Atwood et al., 2011).

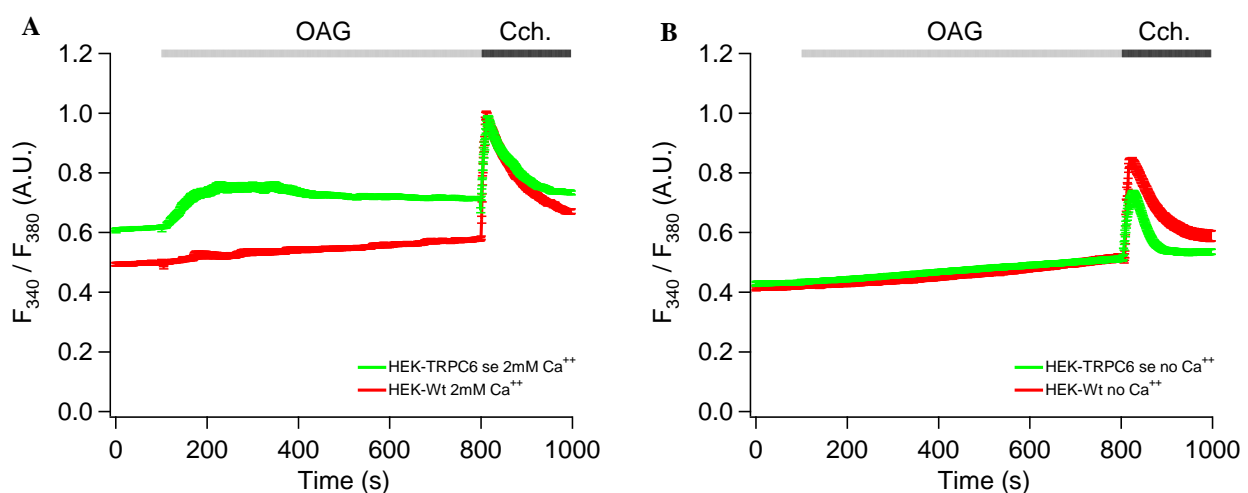
Als Kontroll-Messungen dienten untransfizierte und TRPC6 stabil überexprimierende HEK 293-Zellen. Auch HEK 293-Zellen exprimieren mehrere Unterarten von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (vorwiegend vom Typ M3, aber auch M1 und M4; Atwood et al., 2011). Die Versuche wurden in calciumhaltiger und calciumfreier Badlösung durchgeführt, um zu klären, inwieweit der Calciumionen-Konzentrationsanstieg durch über die Plasmamembran einströmende bzw. aus intrazellulären Speichern freigesetzte Calciumionen hervorgerufen wird.

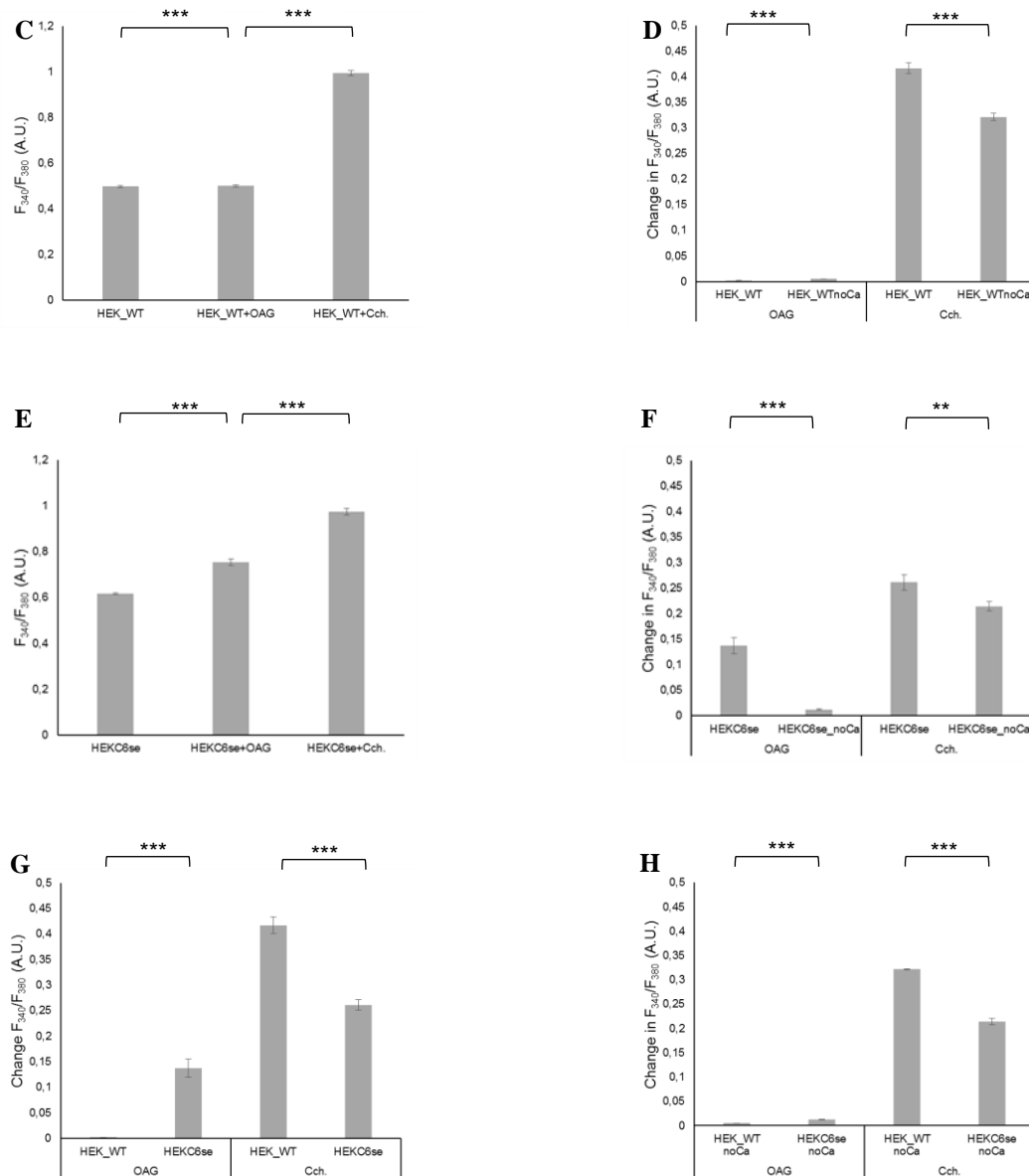
### 4.2.1 Calciumfluorimetrische Untersuchung von HEK 293-Zellen

In calciumfluorimetrischen Untersuchungen an untransfizierten HEK 293-Wildtypzellen („HEK-Wt“) in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung war auf die Applikation von OAG fraglich eine sehr

geringe Reaktion zu beobachten (Differenz vor/nach Applikation 0.002 A.U.), welche sich auf Grund der großen Probenzahl ( $n = 115$  Zellen) und der großen Trennschärfe des T-Tests für gepaarte Stichproben signifikant zeigte ( $p < 0,001$ ; s. Abb. 4.2 A, C). In calciumfreier Badlösung zeigte sich im Vergleich zu den Messungen in calciumhaltiger Badlösung eine erniedrigte Basiskonzentration von Calciumionen in den Zellen. Auf die Applikation von OAG reagierten die Zellen nicht (Abb. 4.2 B). Ein hier statistisch nachweisbarer Unterschied ist eher auf eine über die Zeit leicht ansteigende Fluoreszenz-Ratio, welche bei allen Messungen in calciumfreier Badlösung zu beobachten war, sowie auf die große Probenzahl ( $n = 121$  Zellen) und die große Trennschärfe des T-Tests für gepaarte Stichproben zurückzuführen (Abb. 4.2 D). Nach Applikation von Carbachol zeigte sich sowohl in 2 mM Calcium enthaltender, als auch in calciumfreier Badlösung ein sofortiger Anstieg der Fluoreszenz-Ratio (jeweils  $p < 0,001$ ). Dieser fiel in calciumfreier Badlösung zwar signifikant, jedoch nur wenig geringer aus (s. Abb. 4.2 B-D;  $p < 0,001$ ). Dies bedeutet, dass die Carbachol-vermittelte Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio in HEK 293-Zellen zum größten Teil durch eine Calciumionen-Freisetzung aus intrazellulären Speichern hervorgerufen wird.

In TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen lag die Basiskonzentration intrazellulärer Calciumionen etwas höher als in untransfizierten HEK 293-Zellen. Nach Applikation von OAG war ein deutlicher und anhaltender Anstieg der Fluoreszenz-Ratio messbar ( $p < 0,001$ ). Dieser war in calciumfreier Badlösung nicht nachweisbar. Nach Applikation von Carbachol kam es zu einem raschen Anstieg der Fluoreszenz-Ratio (Ratio vor/nach Applikation:  $p < 0,001$ , Abb. 4.2 A, E). Der Fluoreszenzratio-Anstieg nach Carbachol-Applikation war in TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen zwar *absolut* ähnlich hoch, jedoch auf Grund des höheren Ausgangswertes der Fluoreszenz-Ratio etwas geringer, als in untransfizierten HEK 293-Zellen ( $p < 0,001$ ; Abb. 4.2 G). Auch in calciumfreier Badlösung war bei Carbachol-Applikation ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz-Ratio nachweisbar ( $p < 0,001$ ), die Amplitude war jedoch etwas niedriger als in calciumhaltiger Badlösung ( $p = 0,008$ ; Abb. 4.2 B, F) und als in untransfizierten HEK 293-Zellen ( $p < 0,001$ ; Abb. 4.2 H).





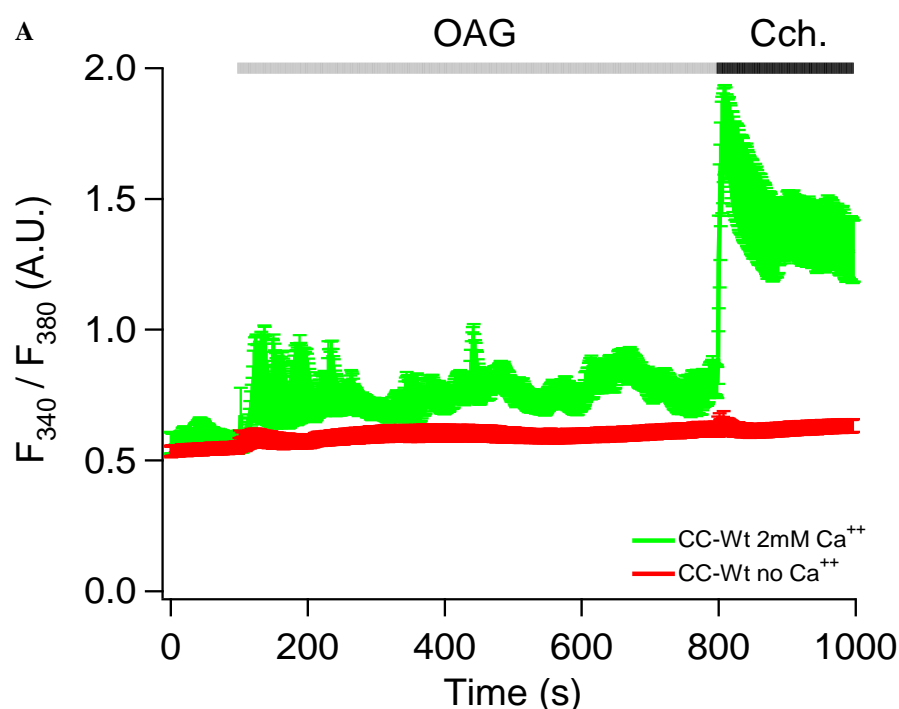
**Abb. 4.2: Verhalten der intrazellulären Calciumionen-Konzentration von untransfizierten und TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen bei Stimulation mit OAG und Carbachol in 2 mM Calcium enthaltender bzw. calciumfreier Badlösung.**

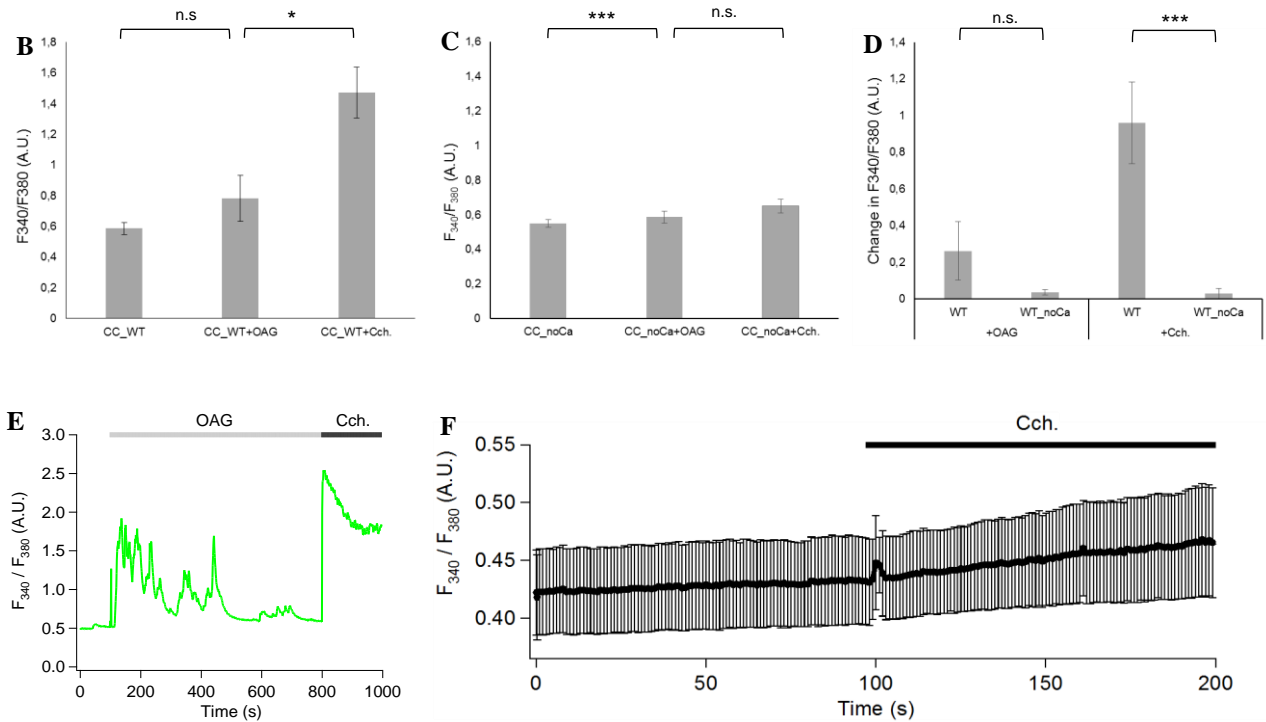
Relative intrazelluläre Calciumionen-Konzentrationen von untransfizierten und TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen in 2mM Calcium enthaltender Badlösung ("HEK-Wt 2 mM  $Ca^{++}$ ", n = 115 Zellen; "HEK-TRPC6 se 2 mM  $Ca^{++}$ ", n = 153 Zellen; Abb. A), sowie in calciumfreier Badlösung ("HEK-Wt no  $Ca^{++}$ ", n = 121 Zellen; "HEK-TRPC6 se no  $Ca^{++}$ ", n = 152 Zellen; Abb. B), dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM des Verhältnisses der Fluoreszenzen bei 340 und 380 nm, angegeben in arbiträren Einheiten (A.U.). Gemessen wurde über 1000 Sekunden. 100 Sekunden nach Messbeginn erfolgte die Applikation von OAG in einer effektiven Konzentration von 100  $\mu$ M. Nach 800 Sekunden erfolgte die Applikation von Carbachol (Cch.) in einer effektiven Konzentration von 500  $\mu$ M. Untransfizierte HEK 293-Zellen: nach OAG minimale Zunahme der Fluoreszenzratio in calciumhaltiger Badlösung. Durch Carbachol jeweils hochsignifikanter Anstieg der Ratio. Dieser fällt in calciumhaltiger Badlösung signifikant höher aus (C; D). TRPC6 stabil überexprimierende HEK 293-Zellen: Signifikanter Fluoreszenzratio-Anstieg nach Applikation von OAG in Anwesenheit von Calcium extrazellulär. Durch Carbachol signifikanter Anstieg der Fluoreszenzratio (E). Durch Carbachol in calciumhaltiger Badlösung signifikant höhere Fluoreszenzratio-Zunahme als in calciumfreier Badlösung (F). Durch OAG signifikant höhere Zunahme der Fluoreszenz-Ratio in TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen im Vergleich zu untransfizierten HEK 293-Zellen. Bei stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen etwas geringere Reaktion auf Carbachol im Vergleich mit untransfizierten HEK 293-Zellen in calciumhaltiger (G) und calciumfreier Badlösung (H). n.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied: \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

## 4.2.2 Calciumfluorimetrische Untersuchung von chromaffinen Nebennierenzellen

Nach erfolgreicher Etablierung des Applikationsschemas erfolgte die Durchführung der Calcium-Imaging-Messungen an chromaffinen Nebennierenzellen von Wildtyp-Mäusen des Stammes 129SvJ. Wie schon bei den TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen zeigte sich auch bei diesen Zellen eine prompte Reaktion auf die Applikation von 100  $\mu\text{M}$  OAG im Sinne eines Anstiegs der Fluoreszenz-Ratio. Diese Reaktion war bei 71 % der Zellen zu sehen. Dabei traten nach dem initialen Anstieg Oszillationen der Fluoreszenz-Ratio auf (Abb. 4.2 E). Bei zwei Zellen kam es zu einem verzögerten Anstieg der Fluoreszenz-Ratio (Ratio vor/nach Applikation:  $p = 0,16$ ). Entsprechend ihrem physiologischen Aktivierungsweg reagierten die chromaffinen Nebennierenzellen auf die Applikation von 500  $\mu\text{M}$  Carbachol ebenfalls mit einem prompten und deutlichen Anstieg der Fluoreszenz-Ratio ( $p = 0,016$ ; Abb. 4.2 A, B).

Während OAG in Anwesenheit von extrazellulären Calciumionen eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz-Ratio in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen bewirkte, zeigte sich so gut wie keine Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio bei den Messungen in calciumfreier Badlösung. Es gab lediglich einen kleinen, jedoch signifikanten Peak (Ratio vor/nach Applikation:  $p < 0,001$ ). Auch die Applikation von 500  $\mu\text{M}$  Carbachol führte lediglich zu einem sehr geringen (nicht signifikanten) Anstieg der Fluoreszenz-Ratio ( $p = 0,06$ ; Abb. 4.2 A, C). Diese Reaktion zeigte sich auch in Kontrollmessungen, bei welchen eine Applikation von 500  $\mu\text{M}$  Carbachol bereits nach 100 Sekunden ohne vorherige OAG-Applikation erfolgte (Abb. 4.2 F). Die OAG-Antwort war knapp nicht signifikant, die Carbachol-Antwort signifikant geringer als in calciumhaltiger Badlösung ( $p 0,2$  bzw.  $< 0,001$ ; Abb. 4.2 D).





**Abb. 4.3: Vergleich des Verhaltens der intrazellulären Calciumionen-Konzentration von chromaffinen Nebennierenzellen von Wildtyp-Mäusen bei Stimulation mit OAG und Carbachol in 2 mM Calcium enthaltender und calciumfreier Badlösung.**

Relative intrazelluläre Calciumionen-Konzentrationen von chromaffinen Nebennierenzellen von Wildtyp-Mäusen des Stammes 129SvJ in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung ("CC-Wt 2 mM  $Ca^{++}$ ", n = 7 Zellen), sowie in calciumfreier Badlösung ("CC-Wt no  $Ca^{++}$ ", n = 15 Zellen), dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM des Verhältnisses der bei 340 und 380 nm gemessenen Fluoreszenzen von Fura-2-AM, angegeben in arbiträren Einheiten (A.U.). Gemessen wurde über 1000 Sekunden. 100 Sekunden nach Messbeginn erfolgte die Applikation von OAG in einer effektiven Konzentration von 100  $\mu$ M. Nach 800 Sekunden erfolgte die Applikation von Carbachol (Cch.) in einer effektiven Konzentration von 500  $\mu$ M (A). Knapp nicht signifikanter Anstieg der Fluoreszenz-Ratio nach Applikation von OAG in calciumhaltiger Badlösung, signifikanter Anstieg in calciumfreier Badlösung (B). Nach Carbachol-Applikation nur in calciumhaltiger Badlösung signifikanter Anstieg der Fluoreszenz-Ratio (C). Geringere Ratio-Zunahmen in calciumfreier Badlösung (D). E: Abbildung einer beispielhaften Messung mit Calcium-Oszillationen nach OAG-Applikation. F: Auch bei Applikation von Carbachol schon nach 100 Sekunden nur minimaler Anstieg der Fluoreszenz-Ratio. n.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied: \*: p < 0,05, \*\*: p < 0,01, \*\*\*: p < 0,001.

#### Zusammenfassung der Ergebnisse:

- 1.) OAG induziert einen Calcium-Einstrom in TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen.
- 2.) Eine anschließende Carbachol-Applikation führt zu einer sofortigen Zunahme der Fluoreszenz-Ratio, wobei diese hauptsächlich durch eine Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern vermittelt wird.
- 3.) Stabil TRPC6 überexprimierende HEK 293-Zellen eignen sich als Positiv-Kontrolle TRPC6-exprimierender Zellen. Zudem sind die gewählten Konzentrationen der Reagenzien geeignet, eine deutliche Stimulation von TRPC6, bzw. muskarinerger Acetylcholinrezeptoren, und damit der Zellen zu bewirken.
- 4.) OAG induziert einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz-Ratio in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen, gefolgt von Oszillationen. Die Applikation von Carbachol führt zu einer sofortigen Zunahme der Fluoreszenz-Ratio.



- 5.) Die Anstiege der intrazellulären Calciumionenkonzentration sowohl nach Applikation von OAG, als auch von Carbachol sind fast ausschließlich durch extrazelluläre Calciumionen vermittelt.

## 4.3 Patch-Clamp-Untersuchungen

Nachdem in molekularbiologischen Voruntersuchungen die Existenz von TRPC6 in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen nachgewiesen wurde und in Calcium-Imaging-Versuchen eine funktionelle Beteiligung OAG-sensitiver Kanäle an der Calciumsignalgebung chromaffiner Nebennierenzellen, insbesondere im Rahmen eines Calciumeinstromes in die Zellen gezeigt werden konnte (4.2.2), erfolgten elektrophysiologische Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der Ströme nach folgendem Schema:

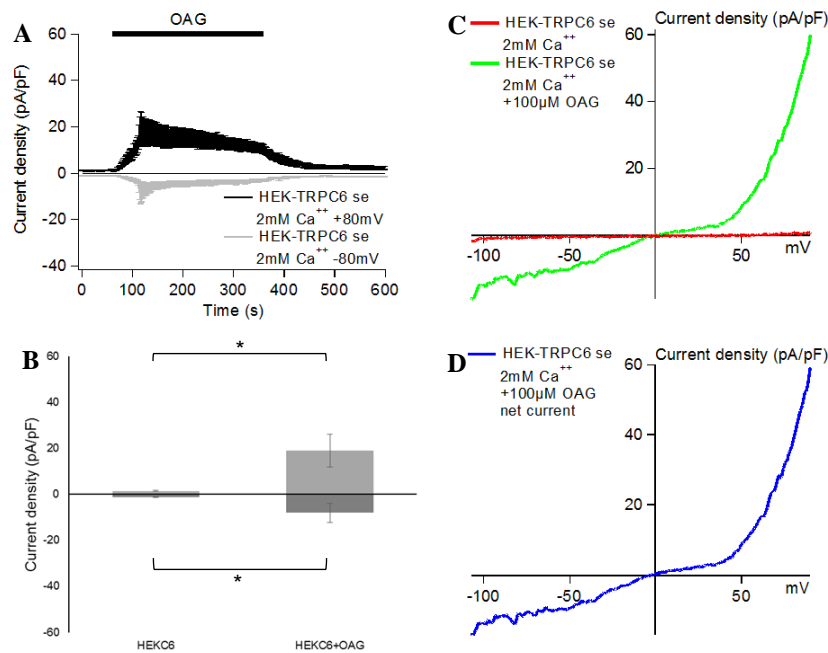
- 1.) Charakterisierung von OAG-aktivierten Strömen in stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen
- 2.) Charakterisierung der durch Carbachol (Rezeptorstimulation) hervorgerufenen Ströme in stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen
- 3.) Charakterisierung OAG- und Carbachol-vermittelter Ströme in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen.

Die Messungen erfolgten jeweils in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung. Zudem erfolgten Messungen in calciumfreier Badlösung zur Beurteilung des Calciumanteils am gemessenen Gesamtstrom. Für TRPC6 wurde eine relativ geringe Calciumselektivität beschrieben (Hofmann et al., 1999; Estacion et al., 2006).

### 4.3.1 Ionenströme TRPC6 überexprimierender HEK 293-Zellen

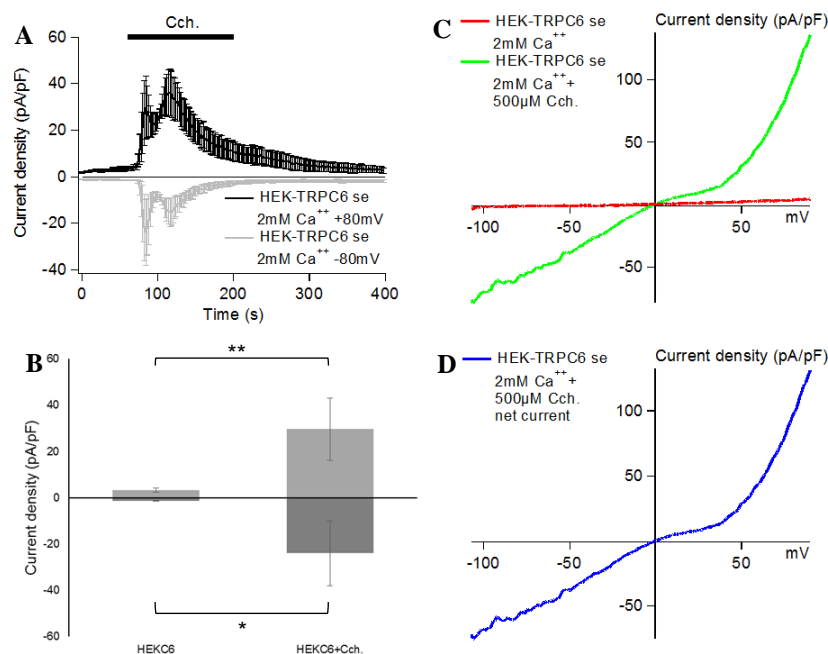
Nach Applikation von 100  $\mu$ M OAG kam es zu einer signifikanten Zunahme des Ein- und Auswärtsstromes in HEK 293-Zellen (gemessen bei -80 mV und + 80 mV;  $p$  0,023 bzw. 0,041; Abb. 4.4 A und B). Der Strom nahm über die Zeit ab und verschwand nach Applikationsende. Die Strom-Spannungs-Kurve des durch die Applikation hervorgerufenen Stromes entsprach der erwarteten, für TRPC6 typischen, umgekehrt S-förmigen, doppelt-gerichteten Strom-Spannungs-Kurve mit einem Umkehrpotential von 0 mV, sowie einem „Sattel“ im Bereich um 0 mV (Boulay et al., 1997; Hofmann et al., 1999; Abb. 4.4 C und D).

Nach Applikation von 500  $\mu$ M Carbachol zeigte sich ebenfalls eine sofortige, signifikante Zunahme des Ein- und Auswärtsstromes ( $p$  = 0,039 bzw. 0,0078; Abb. 4.5). Auch der unter Stimulation mit Carbachol gemessene Strom wies die für TRPC6 typischen Charakteristika in der Strom-Spannungs-Kurve auf. Der doppelgipflig erscheinende Verlauf der Stromdichte über die Zeit (Abb. 4.5 A) ergab sich durch unterschiedlich schnell reagierenden Zellen.



**Abb. 4.4: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen bei Stimulation mit OAG in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch OAG signifikante Stromzunahme bei -80 mV und +80 mV (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation (n = 8). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

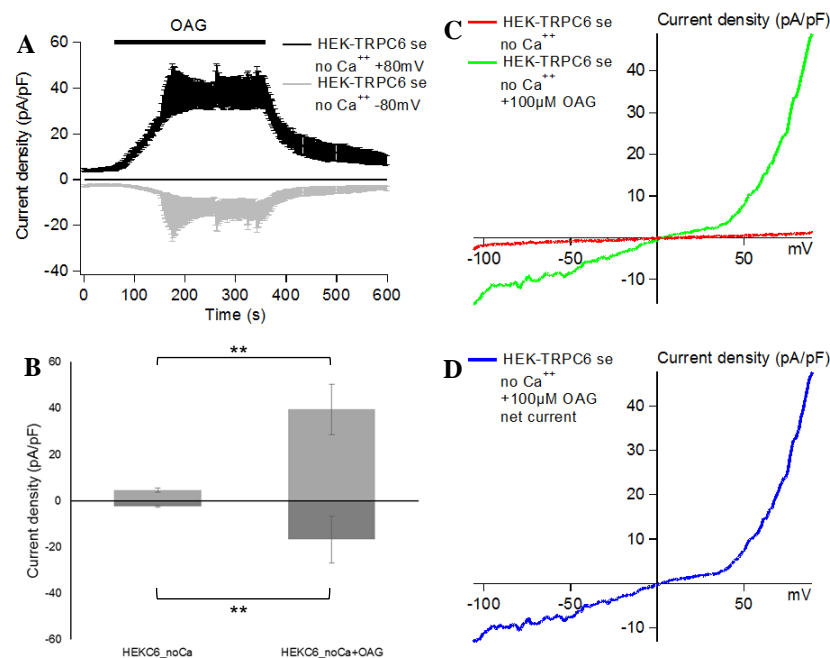


**Abb. 4.5: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen bei Stimulation mit Carbachol in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch Carbachol (Cch.) signifikante Stromzunahme bei -80 mV und +80 mV. Der doppelgipflige Verlauf ergibt sich aus unterschiedlich schnell reagierenden Zellen (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation (n = 8). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

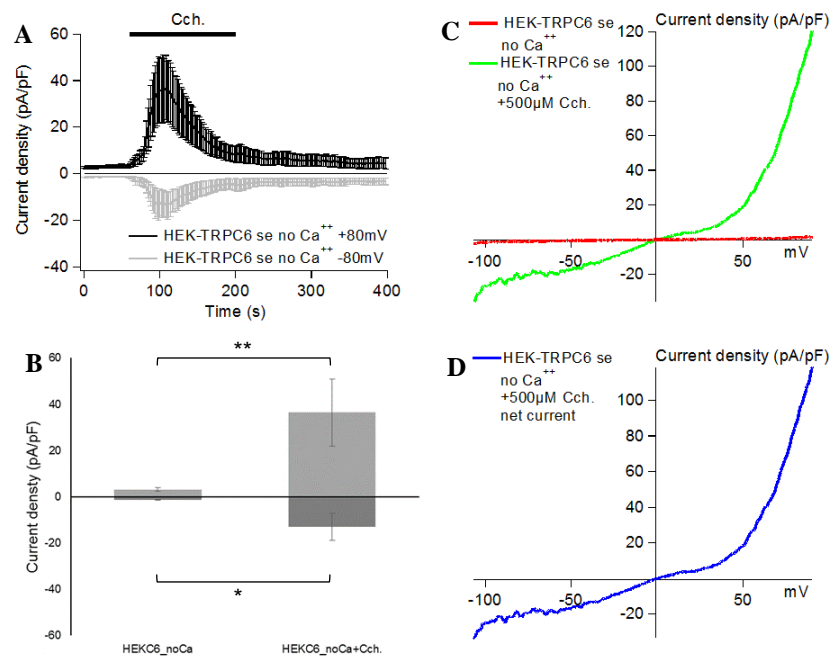
In calciumfreier Badlösung zeigte sich ebenfalls eine Reaktion der Zellen auf die Applikation von 100  $\mu$ M OAG im Sinne einer signifikanten Stromzunahme ( $p =$  jeweils 0,0078; Abb. 4.6). Die gemessenen Ströme waren etwas größer als in calciumhaltiger Badlösung ( $p$  0,51 bzw. 0,16; Abb. 4.8).

Auch auf eine Stimulation mit 500  $\mu$ M Carbachol in calciumfreier Badlösung reagierten die TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen mit einer signifikanten Zunahme des Ein- und Auswärtsstromes ( $p =$  0,016 bzw. 0,0078; Abb. 4.7 A; B). Der Strom zeigte wieder die für TRPC6 typischen Eigenschaften (s. Abb. 4.9 C, D). Der gemessene Auswärtsstrom fiel etwas größer, der Einwärtsstrom etwas geringer aus als bei den Messungen in calciumhaltiger Badlösung ( $p$  0,49 bzw. 0,73; Abb. 4.8).



**Abb. 4.6: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen bei Stimulation mit OAG in calciumfreier Badlösung.**

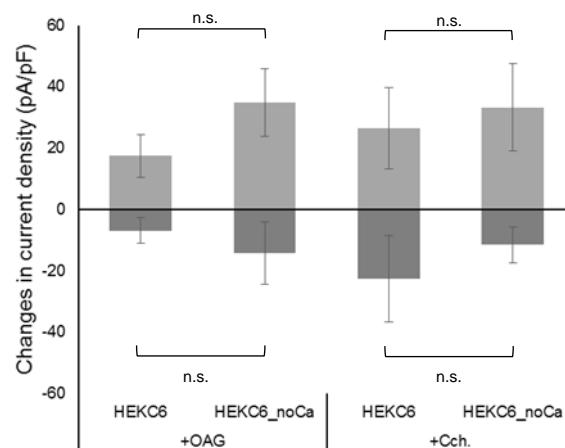
Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch OAG signifikante Stromzunahme bei -80 mV und +80 mV (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation ( $n = 8$ ). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .



**Abb. 4.7: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen bei Stimulation mit Carbachol in calciumfreier Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch Carbachol (Cch.) signifikante Stromzunahme bei -80 mV und +80 mV (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation (n = 8). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Durch die o.g. Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass das gewählte Messschema geeignet ist, TRPC6-spezifische Ströme zu aktivieren und zu detektieren. Zudem zeigte sich, dass sich die in den Calcium-Imaging-Versuchen detektierten Fluoreszenzzunahmen mit der Aktivierung von TRPC6 decken.



**Abb. 4.8: Vergleich der Änderungen der Stromdichte von TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen bei Stimulation mit OAG bzw. Carbachol in 2 mM Calcium enthaltender vs. calciumfreier Badlösung.**

Dargestellt ist die Änderung der Stromdichte  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV bei Stimulation mit OAG bzw. Carbachol (Cch.) in 2 mM Calcium enthaltender und calciumfreier Badlösung. (Jeweils nicht statistisch signifikante) Zunahme des OAG-induzierten Ein- und Ausstromes, sowie Zunahme des Carbachol-induzierten Aus- und Abnahme des Einstromes bei Messung in calciumfreier Badlösung. n.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied: \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

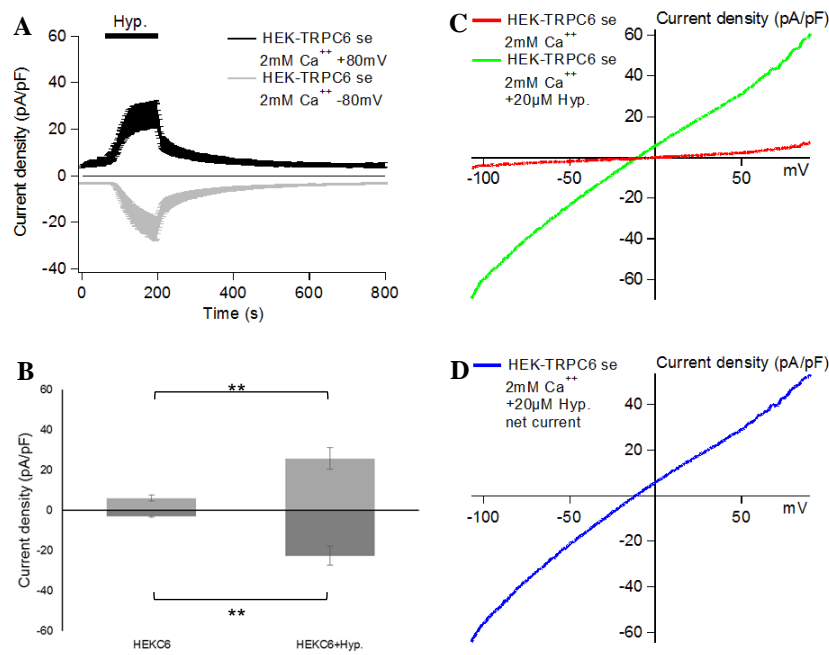
Im Vergleich zeigte sich eine (statistisch nicht signifikante) Zunahme des OAG-induzierten Ein- und Ausstromes bei Messung in calciumfreier Badlösung ( $p$  0,51 bzw. 0,16), sowie eine leichte, ebenfalls statistisch nicht signifikante Zunahme des Carbachol-induzierten Aus- und Abnahme des Einstromes bei Messung in calciumfreier Badlösung ( $p$  0,49 bzw. 0,73; Abb. 4.8). Die Unterschiede sprechen für eine Calcium-abhängige Regulation von TRPC6, sowie eine veränderte Leitfähigkeit für die anderen Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). Die Differenzen waren jedoch nicht statistisch signifikant und können auch durch die sich gering unterscheidende Reaktion der einzelnen untersuchten Zellen bedingt sein.

#### **4.3.2 Wirkung von Hyperforin auf Ionenströme TRPC6 überexprimierender und untransfizierter HEK 293-Zellen**

Hyperforin, ein Hauptwirkstoff des Johanniskrauts, wurde als selektiver Aktivator von TRPC6 beschrieben (Leuner et al., 2007). Damit erschien eine Differenzierung durch OAG ausgelöster Ströme in TRPC6- und TRPC3-/7-Stromanteile möglich. Zur Erstellung von Referenz-Strom-Spannungskurven und zur Verifizierung der Wirkung von Hyperforin auf TRPC6 erfolgten zunächst Messungen mit 20  $\mu\text{M}$  Hyperforin (Leuner et al., 2007) an stabil TRPC6 überexprimierenden und untransfizierten HEK 293-Zellen. Anschließend sollte geprüft werden, ob der durch OAG hervorgerufene Calciumionen-Einstrom in chromaffine Nebennierenzellen *allein* TRPC6-vermittelt ist, oder ob er teilweise durch andere Ionenkanäle (TRPC3, -7) vermittelt wird.

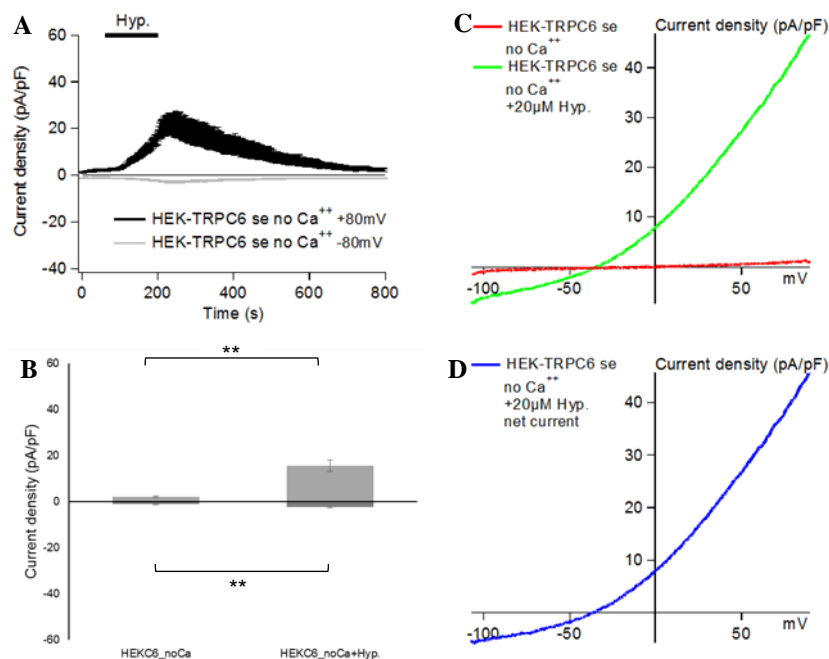
Die Applikation von 20  $\mu\text{M}$  Hyperforin bewirkte bei stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen eine sofortige Zunahme der Stromdichte. Die Strom-Spannungs-Kurve zeigte einen annähernd linearen, leicht umgekehrt S-förmigen Verlauf mit einem Umkehrpotential bei etwa -10 mV (Abb. 4.9 C; D). Die Stromdichte sowohl bei -80 mV, als auch bei +80 mV nahm nach Applikationsbeginn zunächst steil, im Verlauf dann bis zum Applikationsende nach 140 Sekunden etwas weniger stark zu ( $p = 0,005$  bzw. 0,0037; Abb. 4.9 A; B). Die Art der Reaktion unterschied sich deutlich von der zuvor gezeigten Reaktion auf OAG und Carbachol, und zwar sowohl in der Kinetik der Stromdichtenzunahme, als auch in der Form der Strom-Spannungs-Kennlinie selbst (s. 4.3.1).

Auch bei den Messungen in calciumfreier Badlösung bewirkte die Applikation von Hyperforin eine signifikante Zunahme der Stromdichte (Stromdichte vor/während Applikation:  $p = 0,0039$  bzw. 0,0016; Abb. 4.10 A; B). Im Gegensatz zu den Messungen in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung fehlte der Einwärtsstrom jedoch fast vollständig ( $p < 0,001$ ; Abb. 4.13 A) und das Umkehrpotential verschob sich zu etwas negativeren Werten. Zudem kam es zu einem insgesamt deutlich langsameren Anstieg der Stromdichte des Auswärtsstromes, sowie nach Applikationsende zu einem ebenfalls deutlich langsameren Abfall derselben. Der Anstieg der Stromdichte fiel nicht ganz so hoch aus wie bei den Messungen in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung ( $p = 0,24$ ; Abb. 4.13 A).



**Abb. 4.9: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen bei Stimulation mit Hyperforin in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch Hyperforin (Hyp.) signifikante Stromzunahme bei -80 mV und +80 mV (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation (n = 8). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

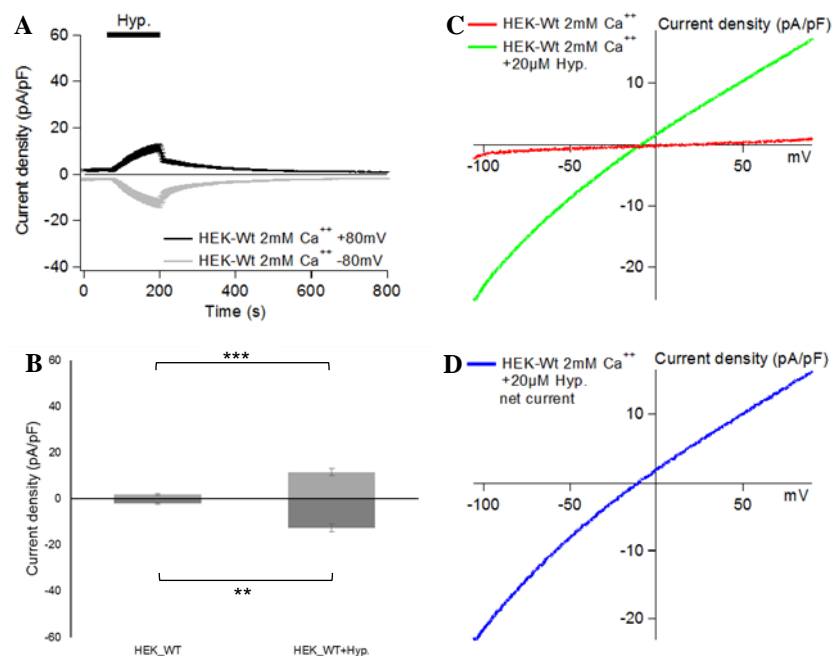


**Abb. 4.10: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen bei Stimulation mit Hyperforin in calciumfreier Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch Hyperforin (Hyp.) signifikante Stromzunahme bei -80 mV und +80 mV (A; B; n = 8). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Die Applikation von Hyperforin bewirkte überraschend auch bei untransfizierten HEK 293-Zellen eine sofortige, signifikante Zunahme der Stromdichte (Stromdichte vor/während Applikation:  $p = 0,0078$  bzw.  $< 0,001$ ; Abb. 4.11 A; B). Der Strom entsprach in Form und Kinetik dem an stabil TRPC6 überexprimierenden Zellen nachgewiesenen (Abb. 4.10+11 C; D). Die Stromzunahme war jedoch nur halb so groß wie bei stabil TRPC6 exprimierenden HEK 293-Zellen, wobei die Differenz der Reaktionen im Wilcoxon-Rangsummen-Test keine statistisch signifikanten Niveaus erreichten ( $p = 0,28$  bzw.  $0,08$ ; Abb. 4.13 B).

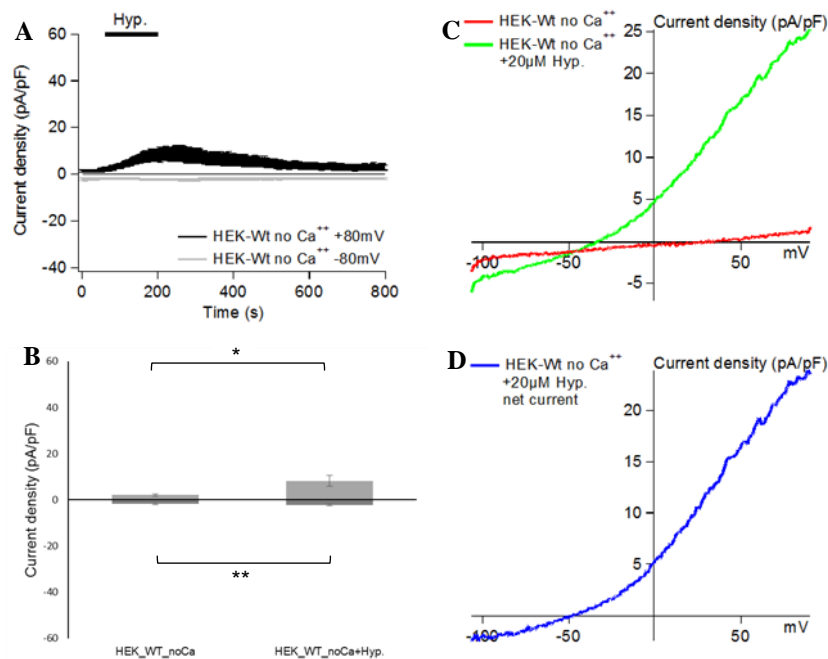
Bei den Messungen mit untransfizierten HEK 293-Zellen in calciumfreier Badlösung zeigte sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der Stromdichte bei Applikation von Hyperforin ( $p = 0,0078$  bzw.  $0,025$ , Abb. 4.12 A; B). Die Stromzunahme fiel im Vergleich zu den Messungen in calciumhaltiger Badlösung erneut geringer aus, wobei hiervon besonders der Einwärtsstrom betroffen war (Abb. 4.13 A,  $p < 0,001$ , bzw.  $0,13$ ). Die Form der Strom-Spannungskennlinie, wie auch die Kinetik der Stromzunahme entsprach den Messergebnissen an stabil TRPC6 überexprimierenden Zellen in calciumfreier Badlösung (Abb. 4.9+12 C; D). Ähnlich den Messungen an untransfizierten HEK 293-Zellen in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung war der detektierte Strom im Vergleich zu den Messungen an stabil TRPC6 überexprimierenden Zellen nur etwa halb so groß ( $p = 0,049$  bzw.  $0,038$ , Abb. 4.13 B).



**Abb. 4.11: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von untransfizierten HEK 293-Zellen bei Stimulation mit Hyperforin in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch Hyperforin (Hyp.) signifikante Stromzunahme bei -80 mV und +80 mV (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation ( $n = 8$ ). \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .





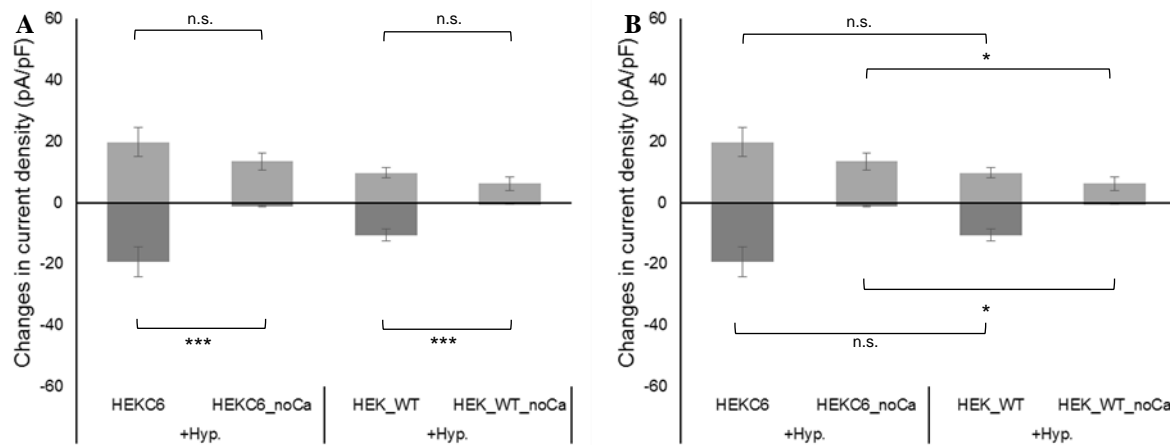
**Abb. 4.12: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von TRPC6 untransfizierten HEK 293-Zellen bei Stimulation mit Hyperforin in 2 mM calciumfreier Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch Hyperforin (Hyp.) signifikante Stromzunahme bei -80 mV und +80 mV (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation (n = 8). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Zusammenfassend zeigte sich eine Zunahme des Ein- und Auswärtsstromes in stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen bei Hyperforin-Applikation. Dieser unterschied sich jedoch in folgenden Punkten von den Messergebnissen mit OAG und Carbachol:

- 1.) Deutlich veränderte, fast lineare Strom-Spannungs-Kennlinie mit einem deutlich negativeren Umkehrpotential
- 2.) Hohe Calciumselektivität
- 3.) Bei untransfizierten Zellen um die Hälfte reduzierte, ansonsten jedoch identische Stromzunahme bei Hyperforin-Applikation.

Eine spezifische und alleinige Aktivierung von TRPC6 durch Hyperforin konnte somit nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund erfolgten keine weiteren Messungen mit Hyperforin.



**Abb. 4.13: Vergleich der Änderungen der Stromdichte von TRPC6 stabil überexprimierenden und untransfizierten HEK 293-Zellen bei Stimulation mit Hyperforin in 2 mM Calcium enthaltender und calciumfreier Badlösung.**

Dargestellt ist die Änderung der Stromdichte  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV bei Stimulation mit 20  $\mu$ M Hyperforin (Hyp.) in 2 mM Calcium enthaltender und calciumfreier Badlösung. Jeweils signifikante Abnahme des Hyperforin-induzierten Einstromes bei Messung in calciumfreier Badlösung. Im Vergleich TRPC6 stabil überexprimierender und untransfizierter HEK 293-Zellen nur in calciumfreier Badlösung statistisch signifikant geringere Ströme ( $n$  = jeweils 8). n.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied: \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

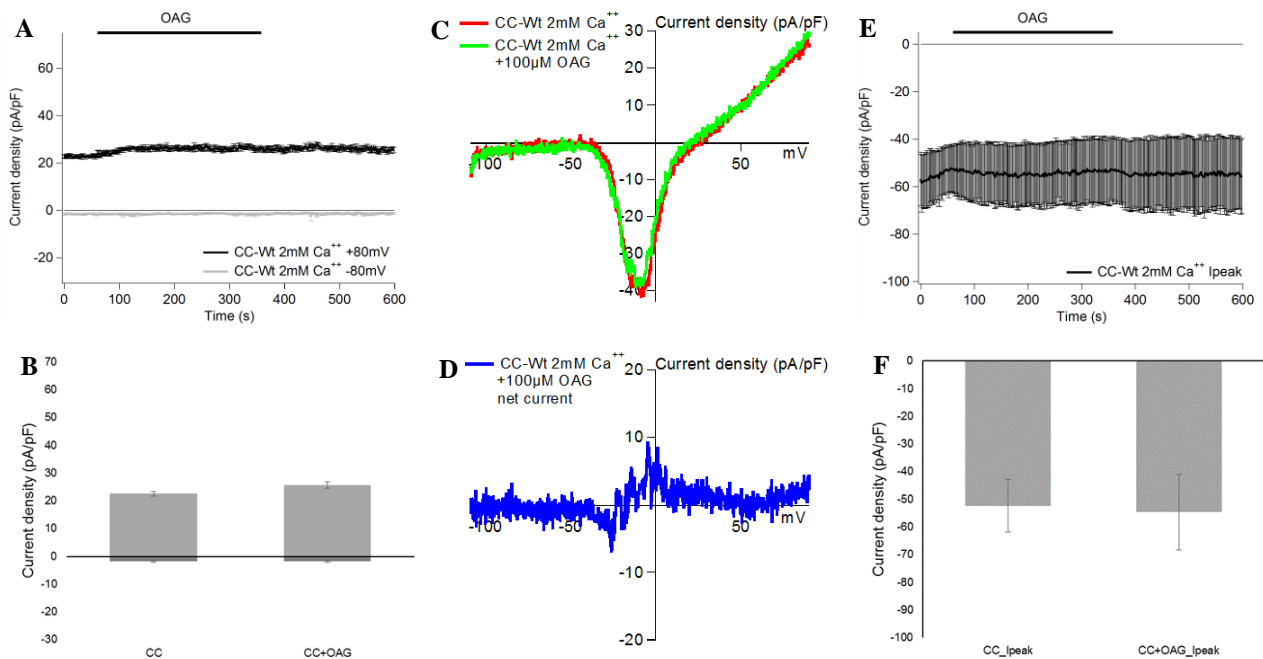
### 4.3.3 Wirkung von 1-Oleyl-2-acetyl-sn-glycerol und Carbachol auf Ionenströme chromaffiner Nebennierenzellen

Nachdem in den Untersuchungen an stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen gezeigt werden konnte, dass das gewählte Messschema geeignet ist, TRPC6-spezifische Ströme mittels OAG-, bzw. Carbachol-Applikation zu aktivieren und zu detektieren (4.3.1), erfolgten Messung an chromaffinen Nebennierenzellen von 129SvJ-Wildtypmäusen.

Während der Stimulation chromaffiner Nebennierenzellen mit 100  $\mu$ M OAG konnte keine Veränderung der Stromdichte festgestellt werden (Abb. 4.14 A; B). Ein TRPC6-typischer Strom war nicht detektierbar (Abb. 4.14 C; D). Auch im Bereich der die Aktivität der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumionenkanäle darstellenden „U-Kurve“ gab es keine Veränderungen (Abb. 4.14 E; F). Die in der Darstellung des Nettostromes nach Applikation teilweise sichtbaren Artefakte sind auf kleine Schwankungen in der Aktivität der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumionenkanäle und einer damit verbundenen unsauberen Subtraktion der Ströme zurückzuführen.

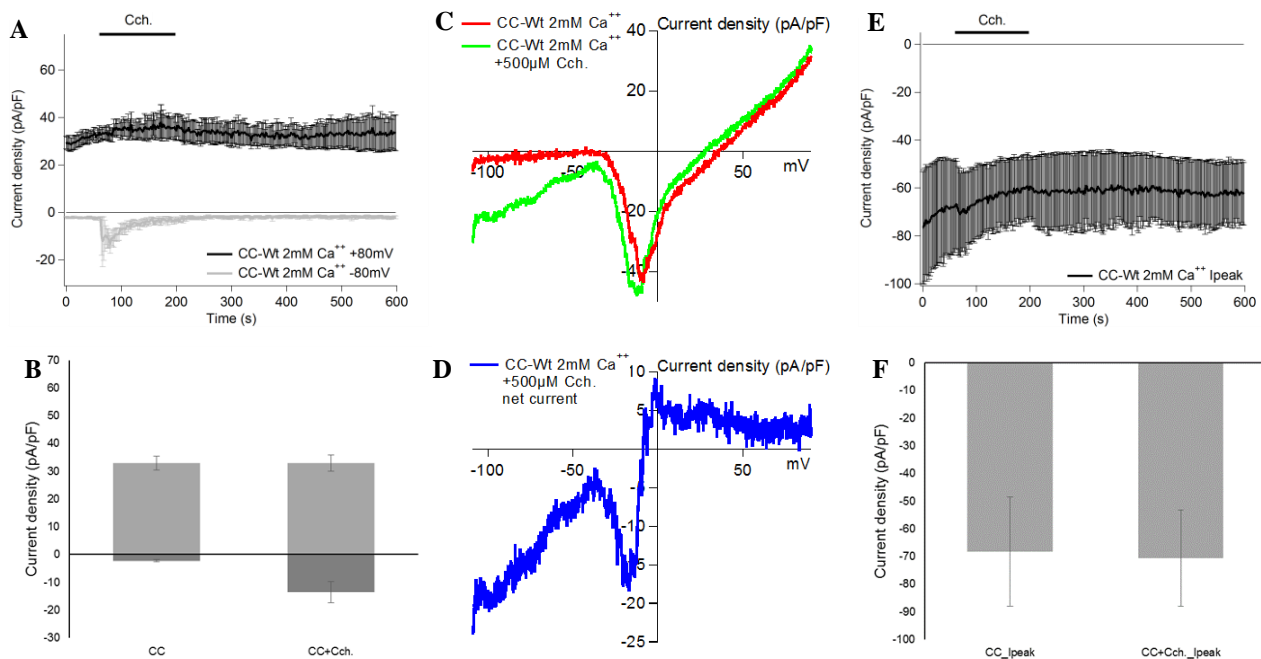
Bei Stimulation mit 500  $\mu$ M Carbachol zeigte sich wenige Sekunden nach Applikationsbeginn eine Zunahme des Einwärtsstromes (Abb. 4.15 A; B). Der detektierte Strom zeigte im Bereich negativer Membranpotentiale einen Einwärtsstrom mit annähernd linearer Zunahme des Stromes mit sinkendem Membranpotential. Das Umkehrpotential lag geschätzt bei ca. -10 mV. Oberhalb dieses

Wertes war kein zusätzlicher Strom zu messen. Der Strom nahm rasch an Stärke ab und verschwand vollständig mit Ende der Applikation (Abb. 4.15 C; D). Die Stromdichte im Bereich der „U-Kurve“ änderte sich nicht (Abb. 4.15 E; F). Ein für TRPC6 typischer Strom mit umgekehrt s-förmiger Strom-Spannungs-Kurve konnte nicht gemessen werden.



**Abb. 4.14: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von chromaffinen Nebennierenzellen (CC) bei Stimulation mit OAG in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch OAG keine Stromänderung detektierbar (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation. In (E; F) Darstellung der Stromdichte des Spitzenstromes der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle („Ipeak“). Durch die Applikation von OAG auch hier keine Änderung sichtbar (n = 4).



**Abb. 4.15: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von chromaffinen Nebennierenzellen (CC) bei Stimulation mit Carbachol in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch Carbachol-Applikation (Cch.) Aktivierung eines Stromes, charakterisiert durch einen Einstrom bei negativen Membranpotentialen, Umkehrpotential um -10 mV und keinem messbarem Strom bei positiven Membranpotentialen (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation. In (E; F) Darstellung der Stromdichte des Spitzenstromes der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle („Ipeak“). Durch die Applikation von Carbachol waren hier keine Änderung sichtbar ( $n = 4$ ).

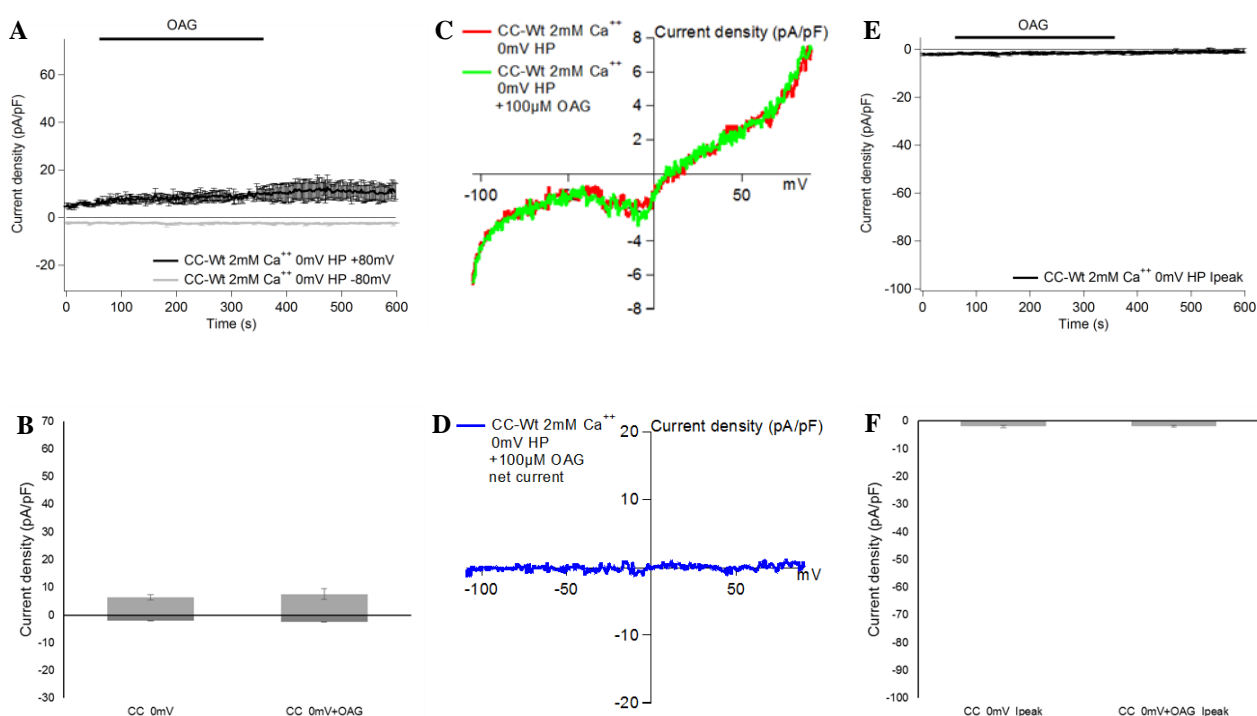
Da unter den o.g. Messbedingungen keine für TRPC6 typischen Ströme abgeleitet werden konnten, erfolgten Versuchsreihen unter folgenden modifizierten Messbedingungen:

- 1.) Messungen mit einem Haltepotential von 0 mV. Durch diese Modifikation sollte die Überlagerung eines TRPC6-Stromes durch spannungsabhängige Natrium- und Calciumionenkanäle ausgeschlossen werden. Diese werden bei Zellpotentialwerten  $> 60$  mV aktiviert und innerhalb 1 ms inaktiviert. Bei ausbleibender Repolarisation (Haltepotential 0 mV) bleiben sie weitestgehend inaktiv (Falkner und Jonas, 2010).
- 2.) Um den Einfluss von Kalium-Kanälen auf das Messergebnis zu eliminieren und um zu überprüfen, ob der durch die Carbachol-Applikation aktivierte Strom ein Kalium-Strom ist, wurden die Messungen in einer 10 mM CsCl enthaltenden Badlösung wiederholt. Cäsiumchlorid führt zu einer Inaktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Gay und Stanfield, 1977). Cäsium in der Badlösung eliminiert Kalium-vermittelte Einwärtsströme. Die Kalium-vermittelten Auswärtsströme waren auf Grund der Cäsium-haltigen Pipettenlösung bereits unter Standardbedingungen blockiert.
- 3.) TRPC6 wird durch höhere Calciumionen-Konzentrationen gehemmt. Bei niedrigen

Calciumionen-Konzentrationen ist eine stärkere Aktivierung zu beobachten (Jung et al., 2001; Shi et al., 2004; s. auch Abb. 4.10). Aus diesem Grund wurden die Messungen in einer 200  $\mu$ M Calcium enthaltenden Badlösung wiederholt. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass die TRPC6-Ströme auf Grund einer geringen Größe unter Standardbedingung nicht detektierbar sind.

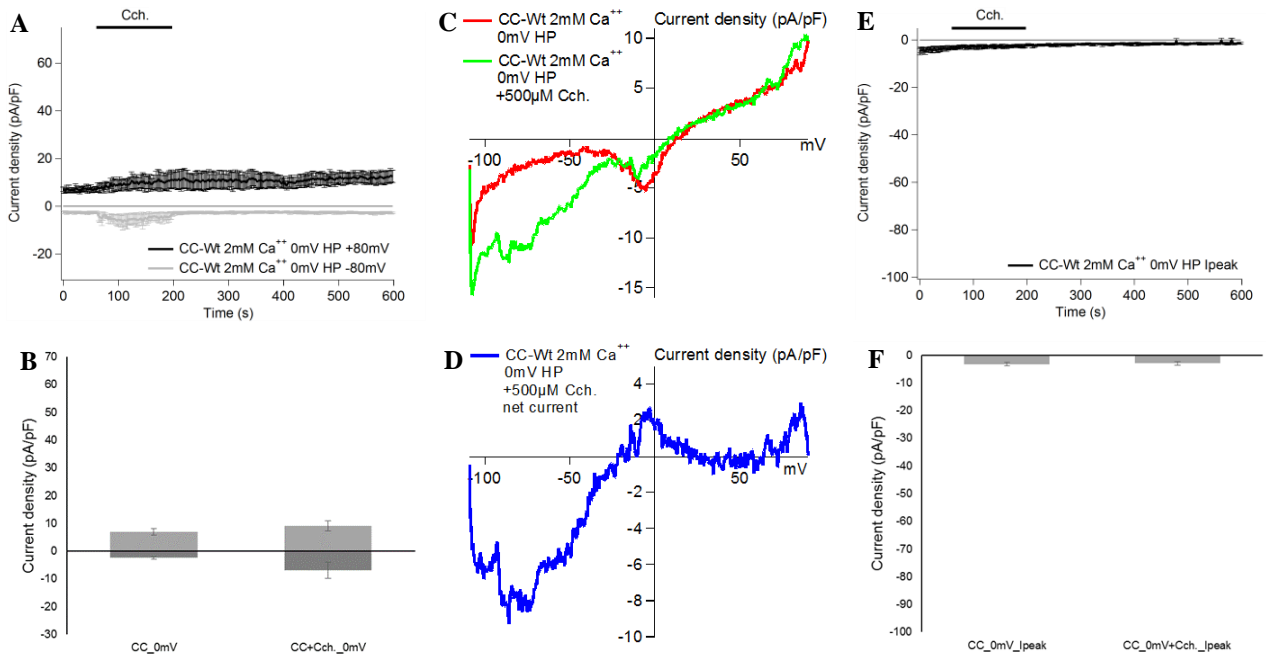
In den Messungen mit 0 mV Haltepotential zeigte sich eine insgesamt etwas niedrigere Stromdichte (Abb. 4.16 A; B). Die spannungsabhängigen Natrium- und Calciumionenkanäle konnten bis auf eine geringe Restaktivität, welche wahrscheinlich die P-Typ-Kanäle repräsentiert (s. Garcia et al., 2006) effektiv ausgeschaltet werden (Abb. 4.16 E; F). Durch die OAG-Applikation kam es zu keiner Änderung der Stromdichte (Abb. 4.16 A; B). Die Aktivierung eines TRPC6-Stromes konnte nicht gemessen werden (Abb. 4.16 C; D).

Bei Stimulation mit Carbachol zeigte sich erneut der unter Standardbedingungen sichtbare, einwärts gerichtete Strom. (Abb. 4.17 A-D). Die spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle konnten erneut effektiv inaktiviert werden. Die (restliche) Stromdichte im Bereich „U-Kurve“ änderte sich nicht (Abb. 4.17 E; F). Ein für TRPC6 typischer Strom konnte nicht gemessen werden.



**Abb. 4.16: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von chromaffinen Nebennierenzellen (CC) bei Stimulation mit OAG in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung mit 0 mV Haltepotential.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch OAG keine Stromänderung detektierbar (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation. In (E; F) Darstellung der Stromdichte des Spitzenstromes der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle („I<sub>peak</sub>“). Durch die Applikation von OAG auch hier keine Änderung sichtbar (n = 2).

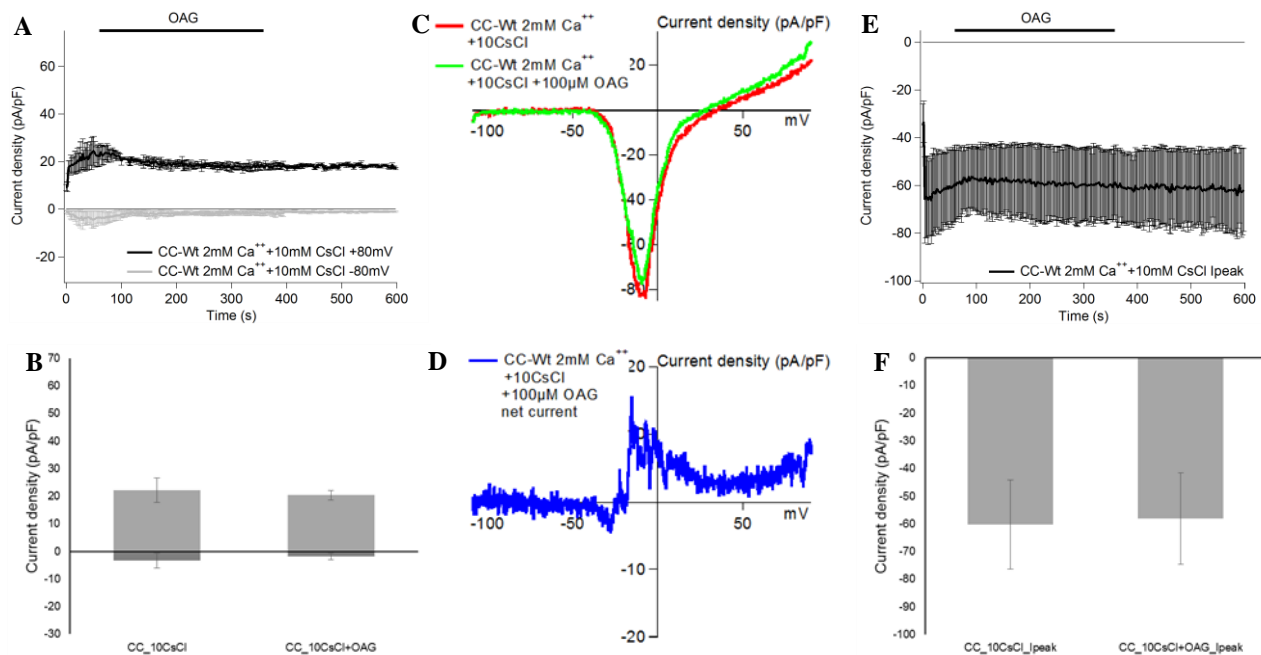


**Abb. 4.17: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von chromaffinen Nebennierenzellen (CC) bei Stimulation mit Carbachol in 2 mM Calcium enthaltender Badlösung mit 0 mV Haltepotential.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch Carbachol-Applikation (Cch.) Aktivierung eines Stromes, charakterisiert durch einen Einstrom bei negativen Membranpotentialen, Umkehrpotential um -10 mV und keinem messbarem Strom bei positiven Membranpotentialen (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation. In (E; F) Darstellung der Stromdichte des Spitzenstromes der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle („Ipeak“). Durch die Applikation von Carbachol waren hier keine Änderung sichtbar (n = 3).

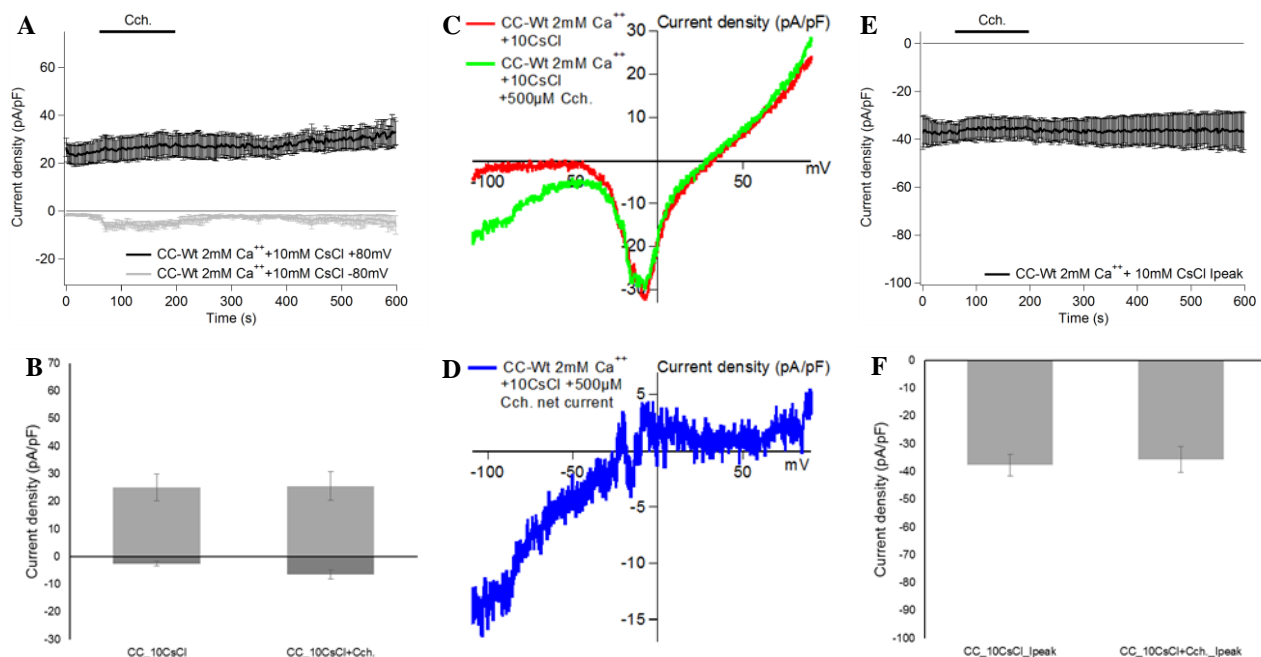
Auch bei den Messungen mit 10 mM CsCl in der Badlösung konnte unter Applikation von OAG keine Änderung der Stromdichte gemessen werden (Abb. 4.18 A-D). Eine zu Beginn der Messung sichtbare Veränderung der Stromdichte bei -80 mV und +80 mV ist auf unruhige Messbedingungen zurückzuführen und fand bereits vor Applikationsbeginn statt. Auch im Bereich der „U-Kurve“ kam es durch die OAG-Applikation zu keiner Änderung der Stromdichte (Abb. 4.18 E; F).

Durch die Applikation von Carbachol konnte erneut der o.g., einwärts gerichtete Strom aktiviert werden. Somit ist der gemessene Strom kein Kalium-Strom (Abb. 4.19 A-D). Die Stromdichte im Bereich der „U-Kurve“ änderte sich nicht (Abb. 4.19 E; F). Ein für TRPC6 typischer Strom konnte erneut nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 4.18: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von chromaffinen Nebennierenzellen (CC) bei Stimulation mit OAG in 2 mM Calcium und 10 mM CsCl enthaltender Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch OAG keine Stromänderung detektierbar (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation. In (E; F) Darstellung der Stromdichte des Spitzenstromes der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle („Ipeak“). Durch die Applikation von OAG auch hier keine Änderung sichtbar (n = 2).

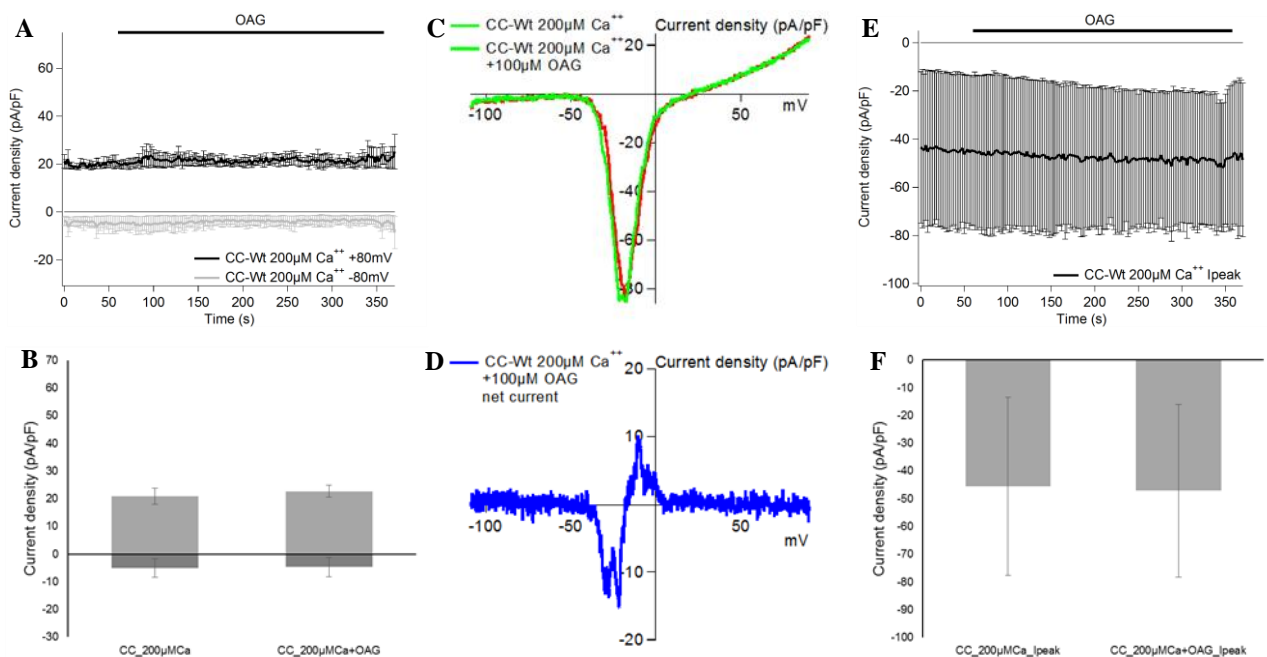


**Abb. 4.19: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von chromaffinen Nebennierenzellen (CC) bei Stimulation mit Carbachol in 2 mM Calcium und 10 CsCl enthaltender Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch Carbachol-Applikation (Cch.) Aktivierung eines Stromes, charakterisiert durch einen Einstrom bei negativen Membranpotentialen, Umkehrpotential um -10 mV und keinem messbarem Strom bei positiven Membranpotentialen (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation. In (E; F) Darstellung der Stromdichte des Spitzenstromes der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle („Ipeak“). Durch die Applikation von Carbachol waren hier keine Änderung sichtbar (n = 3).

Auch in den Messungen mit 200  $\mu\text{M}$  Calcium enthaltender Badlösung konnte keine Änderung der Stromdichte bei OAG-Applikation nachgewiesen werden (Abb. 4.20 A; B). Eine Aktivierung eines TRPC6-Stromes konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.20 C; D). Durch die OAG-Applikation kam es zu keiner Änderung der Stromdichte im Bereich der „U-Kurve“ (Abb. 4.20 E; F).

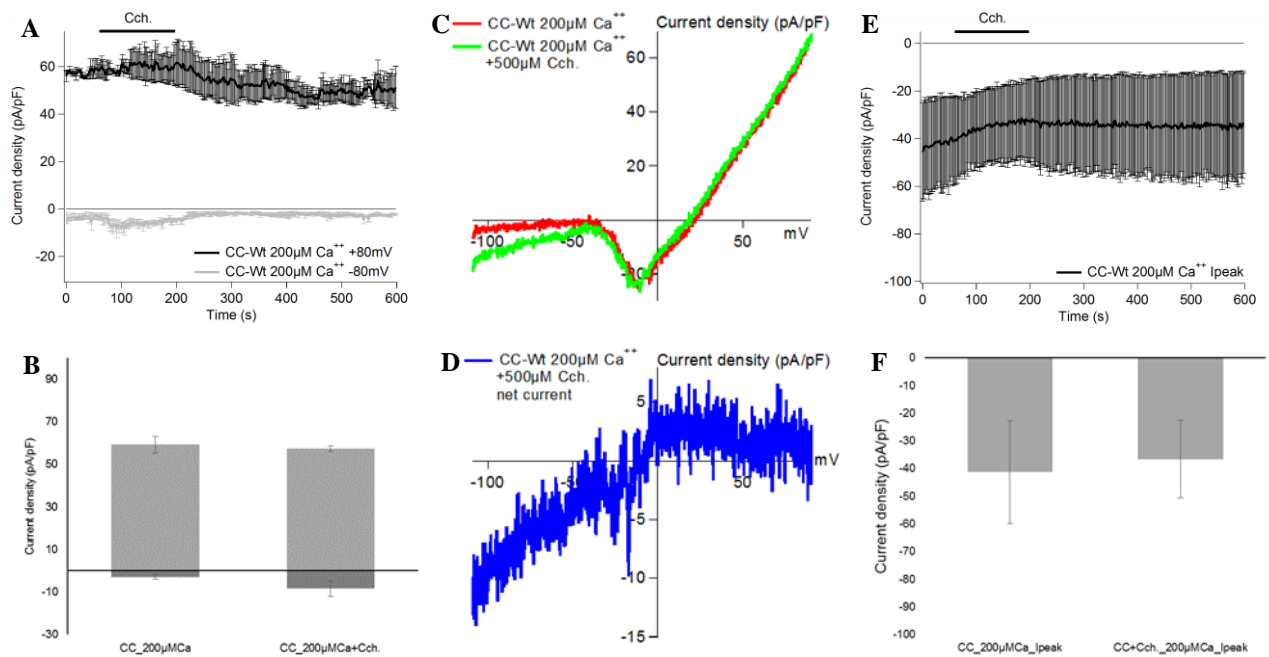
Zu Beginn der Applikation von Carbachol konnte erneut der bereits oben beschriebene, einwärts gerichtete Strom gemessen werden (Abb. 4.21 A; B). Die Stromdichte im Bereich der „U-Kurve“ änderte sich nicht (Abb. 4.21 E; F). Die Aktivierung eines für TRPC6 typischen Stromes konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.21 C; D). Der Basisstrom der Zellen, insbesondere der Auswärtsstrom war in diesen Experimenten höher als in den vorangegangenen.



**Abb. 4.20: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von chromaffinen Nebennierenzellen (CC) bei Stimulation mit OAG in 200  $\mu\text{M}$  Calcium enthaltender Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch OAG keine Stromänderung detektierbar (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation. In (E; F) Darstellung der Stromdichte des Spitzenstromes der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle („I<sub>peak</sub>“). Durch die Applikation von OAG auch hier keine Änderung sichtbar (n = 2).





**Abb. 4.21: Stromdichte und Strom-Spannungs-Kurven von chromaffinen Nebennierenzellen (CC) bei Stimulation mit Carbachol in 200  $\mu$ M Calcium enthaltender Badlösung.**

Dargestellt sind die Stromdichten  $\pm$  SEM bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (A). Durch Carbachol-Applikation (Cch.) Aktivierung eines Stromes, charakterisiert durch einen Einstrom bei negativen Membranpotentialen, Umkehrpotential um -10 mV und keinem messbarem Strom bei positiven Membranpotentialen (A; B). C: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle in Ruhe (rot) und nach Applikation (grün). In (D) Darstellung des durch die Applikation hervorgerufenen Nettostromes. Dazu erfolgte die Subtraktion des Ruhestroms vom Maximalstrom unter Applikation. In (E; F) Darstellung der Stromdichte des Spitzenstromes der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle („Ipeak“). Durch die Applikation von Carbachol waren hier keine deutliche Änderung sichtbar (n = 2).

Zusammenfassend zeigte sich, dass sowohl unter den o.g. Standardbedingungen, als auch unter modifizierten Messbedingungen (Messung bei 0 mV Haltepotential, Messung mit 10 CsCl enthaltender Badlösung, Messung mit 200  $\mu$ M Calcium-haltiger Badlösung) keine Aktivierung eines Stromes durch die Applikation von OAG messbar war, obwohl

1. TRPC6 mittels RT-PCR und Western Blot in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen nachgewiesen wurde,
2. OAG in Calcium-Imaging-Experimenten zu einem Calcium-Einstrom in chromaffine Nebennierenzellen von Mäusen führte, und
3. Unter den genannten Bedingungen in TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen mittels OAG-Applikation ein für TRPC6 typischer Strom aktiviert werden konnte.

Aus diesem Grund wurde auf die Durchführung von Messungen in calciumfreier Badlösung verzichtet. Ebenfalls wurden keine weiteren Untersuchungen an chromaffinen Nebennierenzellen von TRPC6-defizienten Mäusen („Negativkontrollen“) durchgeführt.

Auch bei Applikation von Carbachol war keine Aktivierung eines TRPC6-typischen Stromes in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen messbar. Es konnte lediglich ein transienter Strom gemessen werden, welcher durch einen Einwärtsstrom bei negativen Membranpotentialen, einem Umkehrpotential bei ca. -10 mV und keinem messbarem Strom bei positiven Membranpotentialen charakterisiert ist.

# 5 Diskussion

## 5.1 Calcium-Imaging

### 5.1.1 HEK 293-Zellen

In untransfizierten HEK 293-Zellen löste die Applikation von OAG einen minimalen, statistisch jedoch auf Grund der großen Probenzahl signifikanten Anstieg der Fluoreszenz-Ratio aus. Dieser kann durch eine endogene Expression von TRPC3 und TRPC7 bedingt sein (Garcia und Schilling, 1997; Zagranichnaya et al., 2005). Auch eine geringe endogene Expression von TRPC6 wurde von einigen Autoren beschrieben (RT-PCR; Garcia und Schilling, 1997; Wu et al., 2000). Shaw et al. konnten kein TRPC6 in HEK 293-Zellen nachweisen (mRNA Microarray; Shaw et al., 2002). Auch in den Voruntersuchungen zu meiner Arbeit konnte TRPC6 in HEK 293-Zellen nicht nachgewiesen werden (Western blot). Denkbar ist des Weiteren eine durch OAG direkt vermittelte verstärkte IP<sub>3</sub>-Freisetzung mit konsekutiver Calcium-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Reticulum, wie sie von Hisatsune et al. beschrieben wurde (Hisatsune et al., 2005). In calciumfreier Badlösung zeigte sich keine Reaktion auf OAG. Dies spricht gegen letztere These.

Nach Applikation von Carbachol zeigte sich, entsprechend der Expression muskarinerger Acetylcholinrezeptoren (vorwiegend vom Typ M3; Atwood et al., 2011), erwartungsgemäß ein sofortiger intrazellulärer Calciumanstieg. Die Reaktion auf Carbachol fiel in calciumfreier Badlösung signifikant geringer aus, war jedoch weiterhin deutlich sichtbar. Dies bedeutet, dass der Carbachol-vermittelte Anstieg der intrazellulären freien Calciumionen-Konzentration in HEK 293-Zellen zum größten Teil durch eine Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern hervorgerufen wird.

In den Experimenten mit stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen war eine im Vergleich zu den Messungen an untransfizierten HEK 293-Zellen etwas erhöhte Ausgangskonzentration intrazellulärer Calciumionen zu beobachten. Dies kann auf eine zwar geringe, jedoch auf Grund der Überexpression relevante basale Aktivität von TRPC6 zurückzuführen sein (Dietrich et al., 2003). Zudem kann die stabile Überexpression von TRPC6 zu Veränderungen des Proteasoms geführt haben, wie sie in anderen Überexpressionssystemen beobachtet wurde (Wagner et al., 2007).

Nach Applikation von OAG war ein deutlicher, statistisch signifikanter Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration messbar. Der durch die Carbachol-Applikation ausgelöste Anstieg der  $[Ca^{++}]_i$  erreichte ähnliche Konzentrationswerte, wie in untransfizierten HEK 293-Zellen; *absolut* fiel der Anstieg etwas geringer aus. Eine Erklärung hierfür ist die durch die vorherige OAG-Applikation vermittelte, im Vergleich zu untransfizierten HEK 293-Zellen erhöhte zytoplasmatische

Calciumionen-Konzentration. Calcium hemmt konzentrationsabhängig direkt und mittels Calmodulin IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (Adkins und Taylor, 1999; Schlossmann et al. 2000). Zudem könnte die Expression weiterer an der Calcium-Signalgebung beteiligter Proteine (z.B. mAChR, IP<sub>3</sub>-Rezeptoren) durch die stabile Überexpression von TRPC6 verändert sein (Wagner et al., 2007).

Der OAG-vermittelte Anstieg der intrazellulären freien Calciumionen-Konzentration fehlte in calciumfreier Badlösung vollständig. Dies bedeutet, dass die TRPC6-vermittelte Reaktion der HEK 293-Zellen auf OAG allein durch einen Calcium-Einstrom über die Plasmamembran zu Stande kommt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Untersuchungen (Boulay et al., 1997; Zhang und Saffen, 2001) und zur Expression des Ionenkanals TRPC6. Der Anstieg der zytoplasmatischen Calciumionen-Konzentration nach Applikation von Carbachol war bei den Messungen in calciumfreier Badlösung zwar im Vergleich zu den Messungen in calciumhaltiger Badlösung etwas geringer, jedoch deutlich sichtbar, was darauf hinweist, dass die Carbachol-induzierte Calciumionen-Konzentrationserhöhung in HEK 293-Zellen vorwiegend auf die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern zurückzuführen ist. Die Differenz der Reaktionen auf Carbachol in calciumhaltiger und calciumfreier Badlösung könnte auf eine nochmalige Aktivierung von TRPC-Kanälen durch eine Bildung von DAG nach Aktivierung von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren hinweisen. Eine alternative Erklärung für den in calciumfreier Badlösung geringer ausfallenden Anstieg der zytoplasmatischen freien Calciumionen-Konzentration nach Carbachol-Applikation wäre eine gewisse „Auswaschung“ von Calcium aus den Zellen (Rafael und Patzeld, 1987). Diese entsteht in calciumfreier Badlösung durch Verlust von Calciumionen über Austauscher-Pumpen mit konsekutiver Entleerung intrazellulärer Speicher zur Aufrechterhaltung der zytoplasmatischen Calciumhomöostase über so genannte „Leak-Kanäle“ (Takeshima et al., 2015). Der wegfallende speichergesteuerte Calciumeinstrom (SOCE; s. 2.2.4) in calciumfreier Badlösung erklärt den im Vergleich zu den Messungen in calciumhaltiger Badlösung schnelleren Abfall der intrazytoplasmatischen freien Calciumionen-Konzentration nach Carbacholapplikation.

### **5.1.2 Chromaffine Nebennierenzellen**

Die Calcium-Imaging-Messungen erfolgten an Primärzellen von Mäusen des Stamms 129SvJ. In diesen konnte zuvor die Transkription und Expression von TRPC6 mittels RT-PCR und Western Blot nachgewiesen werden. Messungen an PC12-Zellen, einer aus dem Nebennierenmark-Tumor Phäochromozytom gewonnenen, immortalisierten und damit leichter zu kultivierenden Zelllinie, welche in der Vergangenheit als Modell für chromaffine Nebennierenzellen genutzt wurden, erfolgten nicht, da diese sich in ihren Calcium-Transportwegen signifikant von primären chromaffinen Nebennierenzellen unterscheiden (Duman et al., 2008).

In chromaffinen Nebennierenzellen bewirkte die Applikation von 100  $\mu\text{M}$  OAG ebenfalls einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration. Ein sofortiger Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration konnte bei 71 % der Zellen gesehen werden. Bei den anderen Zellen war ein verspäteter Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration zu beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Aktivierung bzw. Hemmung von TRPC6 je nach Zustand der untersuchten Zelle (z.B. Grad der bereits bestehenden Aktivierung; Diaz-Flores et al., 2008). Die chromaffinen Nebennierenzellen reagierten auf OAG mit oszillierenden Erhöhungen der intrazellulären Calciumionen-Konzentration, wie dies auch von anderen Forschungsgruppen für OAG-induzierte (Zhang und Saffen, 2001; Estacion et al., 2006) und über muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vermittelte Calciumionen-Konzentrationserhöhungen beschrieben wurde (Wu, Fann und Kao, 2010). Der Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration war in der abschließenden statistischen Auswertung knapp nicht signifikant, a.e. auf Grund der sehr heterogenen Reaktion der Zellen mit Calciumkonzentrations-Peaks zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Calciumkonzentrationserhöhungen, wie auch die repetitiven Oszillationen waren in Leer-Messungen (Applikation von Badlösung ohne Reagenzien) jedoch nicht zu beobachten.

Die anschließende Carbachol-Applikation erfolgte mit dem Ziel, zu überprüfen, inwieweit die untersuchten Zellen generell vital und reaktionsfähig waren. Die Aktivierung von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren mit nachfolgender Abspaltung von DAG von  $\text{PIP}_2$  stellt zudem einen möglichen physiologischen Aktivierungsweg von TRPC6 dar (Boulay et al., 1997; Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999), wobei eine Beurteilung der Beteiligung von TRPC6 an der Carbachol-vermittelten Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration nach OAG-Applikation auf Grund der hierdurch verursachten Aktivierung von TRPC6 nur bedingt möglich scheint. Auf die Applikation von 500  $\mu\text{M}$  Carbachol zeigte sich ein prompter und deutlicher Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration.

In calciumfreier Badlösung löste die Applikation von OAG überraschender Weise einen kleinen, statistisch signifikanten Anstieg der Fluoreszenz-Ratio aus. Der Verlauf der Fluoreszenzratio-Kurve und die Regelmäßigkeit des Auftretens sprechen für eine tatsächliche kurze Erhöhung der  $[\text{Ca}^{++}]_i$ . Auch in Untersuchungen an Blutplättchen konnte eine minimale Reaktion auf OAG in calciumfreier Badlösung gesehen werden (Hassock et al., 2002). Im Bereich des C-terminalen Endes von TRPC6 wurde eine Domäne nachgewiesen, welche u.a. eine  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-Bindungsstelle beinhaltet („CIRPIB“, s. Abb. 2.3). In Thrombozyten konnte eine Interaktion von TRPC6 mit Typ II  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren beobachtet werden (Co-Immunopräzipitation, Western blot; Redondo et al., 2008; Dionisio et al., 2011). Chromaffine Nebennierenzellen von Mäusen exprimieren alle drei Arten von  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren (Wu, Fann und Kao, 2010). Somit ist eine direkte Aktivierung von  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren im Endoplasmatischen Reticulum durch TRPC6-Proteine denkbar. Es wäre auch eine direkte Stimulation

der IP<sub>3</sub>-Bildung mit konsekutiver Calcium-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Reticulum vorstellbar, wie von Hisatsune et al. beschrieben (Hisatsune et al., 2005). Schließlich wäre auch eine Aktivierung von intrazellulär lokalisierten (TRPC-) Kanälen mit einer konsekutiven Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern möglich. Für TRPC1 wurde eine funktionelle Expression sowohl in der Zellmembran, als auch intrazellulär im Endoplasmatischen Reticulum beschrieben (Alfonso et al., 2008). TRPC1-Homomere scheinen nicht OAG-sensitiv zu sein, jedoch sind Heteromultimere mit Beteiligung von TRPC3 (Liu et al., 2005) und mit TRPC5 und TRPC6 beschrieben worden (Saleh et al., 2009), welche jeweils OAG-sensitiv waren. Auch für TRPV1 wurde eine intrazelluläre Lokalisation beschrieben (Wisnoskey et al., 2003). In einer Untersuchung an Hinterstrangganglion-Neuronen von Ratten wurde eine partielle Aktivierung von TRPV1 durch OAG beschrieben (Woo et al., 2008). Inwieweit die intrazelluläre Aktivierung von TRP-Kanälen jedoch *in vivo* eine Rolle spielt, ist weitgehend unklar (Turner et al., 2003). Was die Messungen jedoch klar zeigen ist, dass die OAG-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration fast ausschließlich durch einen Calciumionen-Einstrom in die Zellen vermittelt wird. Dies spricht für eine funktionelle Beteiligung OAG-sensitiver Kanäle an der Calcium-Signalgebung muriner chromaffiner Nebennierenzellen.

Die Applikation von Carbachol führte in calciumfreier Badlösung lediglich zu einem sehr geringen (statistisch knapp nicht signifikanten) Anstieg der zytosolischen Calciumionen-Konzentration. Eine fast vollständige Auswaschung von Calcium aus intrazellulären Speichern auf Grund der späten Carbachol-Applikation (Sekunde 800 des Messablaufs) ist als Ursache unwahrscheinlich, da kein höherer Anstieg der Fluoreszenz-Ratio zu beobachten war, wenn Carbachol bereits 100 Sekunden nach Messbeginn appliziert wurde (s. Abb. 4.2 F). Zudem konnte in Untersuchungen an chromaffinen Nebennierenzellen von Rindern kein entsprechender Auswaschungs-Effekt gesehen werden (Bödding, 2001). Damit weisen die Ergebnisse auf eine sehr geringe Beteiligung der IP<sub>3</sub>-vermittelten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Reticulum hin. Der Großteil der Calciumionen-Konzentrationserhöhung in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen ist somit abhängig von einem Einstrom von Calciumionen über die Zellmembran. Diese Ergebnisse ähneln den in bovinen chromaffinen Zellen beobachteten Reaktionen (Kao und Schneider, 1985) und konnten durch Untersuchungen von Wu, Fann und Kao (2010) bestätigt werden. Sie zeigten, dass die Erhöhung der [Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub> in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen erstens über einen Calciumionen-Einstrom über nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) und spannungsabhängige Calciumkanäle und zweitens über Second messenger-aktivierte Kanäle (ROCE) nach Aktivierung muskarinerger Acetylcholinrezeptoren (mAChR) erfolgt. Beides führt in einem weiteren Schritt zu einer Calcium-induzierten Freisetzung von Calcium (CICR) aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) über Ryanodinrezeptoren. Die IP<sub>3</sub>-vermittelte Freisetzung von

Calcium aus dem ER hingegen ist marginal. In ihren Untersuchungen bestätigten Wu, Fann und Kao zudem die Expression von TRPC6 in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen (Wu, Fann und Kao, 2010). Ebenfalls nachgewiesen wurde die mRNA der nächst-verwandten, ebenfalls OAG-sensiblen Ionenkanäle TRPC3 und -7, sowie von TRPC2 (wie auch aller anderen TRPC-Ionenkanäle; Wu, Fann und Kao, 2010). TRPC2 ist ein hauptsächlich im Vomeronasalen Organ von Mäusen zu findender Kanal, welcher ebenfalls durch DAG aktiviert wird (Lucas et al., 2003). und mit TRPC6 interagiert (Chu et al., 2004). Ob dies auch in murinen chromaffinen Nebennierenzellen vorkommt, ist unbekannt.

Zusammen sprechen die Untersuchungsergebnisse dafür, dass der Carbachol-vermittelte Anstieg der  $[Ca^{++}]_i$  in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen überwiegend über einen nAChR- und mAChR-vermittelten Einstrom von Calciumionen über die Zellmembran mit anschließendem CICR erfolgt, jedoch kaum über eine  $IP_3$ -vermittelte Freisetzung von Calcium aus dem ER. Dies weist darauf hin, dass der mAChR-vermittelte Anstieg der  $[Ca^{++}]_i$  größtenteils TRPC6- und/oder TRPC2/3/7-vermittelt ist und weitgehend der in den Calcium-Imaging-Versuchen sichtbaren Reaktion nach OAG-Applikation entspricht.

## **5.2 Patch-Clamp-Untersuchungen**

### **5.2.1 TRPC6 stabil überexprimierende HEK 293-Zellen**

In whole-cell Patch-Clamp-Untersuchungen an stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen konnten nach Applikation von 100  $\mu$ M OAG bzw. 500  $\mu$ M Carbachol wie erwartet umgekehrt S-förmige, doppelt-gleichrichtende Ströme mit einem Sattel im Bereich um 0 mV gemessen werden. Diese entsprechen den für TRPC6-Homomere typischen, in verschiedenen Überexpressions-Systemen nachgewiesenen, wie auch endogen vorkommenden Strömen (Boulay et al., 1997: COS-M6-Zellen; Hofmann et al., 1999: CHO-K1-Zellen; Inoue et al., 2001: HEK 293-Zellen; Gefäßmuskelzellen).

In calciumfreier Badlösung zeigten sich ähnlich hohe Stromantworten (s. auch Jung et al., 2001). Die Ergebnisse stehen in Einklang mit den von Estacion et al. publizierten Ergebnissen, nach denen Calcium in Anwesenheit von Natrium nur einen kleinen Teil des gesamten TRPC6-Stromes ausmacht (Estacion et al., 2006). Bei Carbachol-Applikation zeigte sich eine (statistisch nicht signifikante) leichte Abnahme des Ein- und Zunahme des Ausstromes, ähnlich den von Shi et al. beschriebenen Ergebnissen (Shi et al., 2004). Die OAG-induzierten Ströme waren in calciumfreier Badlösung etwas erhöht, im Gegensatz zu den von Shi et al. beschriebenen Messungen. Die Unterschiede der Messungen in 2 mmol Calcium enthaltender und calciumfreier Badlösung sprechen für eine Calcium-

abhängige Regulation von TRPC6, sowie für eine veränderte Leitfähigkeit für die anderen Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). Die Differenzen waren jedoch nicht statistisch signifikant und können teilweise auch auf die heterogene Reaktion der einzelnen untersuchten Zellen zurückzuführen sein.

Mit Hilfe der o.g. Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass das gewählte Messschema geeignet ist, TRPC6-spezifische Ströme zu aktivieren und zu detektieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die in den Calcium-Imaging-Versuchen detektierten Ratiosignale mit der Aktivierung von TRPC6 decken.

### 5.2.2 Messungen mit Hyperforin

Durch Hyperforin konnte eine deutliche Stromzunahme in stabil TRPC6 überexprimierenden HEK 293-Zellen gemessen werden. Der induzierte Strom zeigte einen annähernd linearen, minimal umgekehrt S-förmigen Verlauf mit einem Umkehrpotential von -10 mV. Die Art der Reaktion unterschied sich damit stark von der zuvor gezeigten Reaktion auf die Applikation von OAG bzw. Carbachol, und zwar sowohl in der Kinetik der Stromdichtenzunahme, als auch in der Form der Strom-Spannungs-Kennlinie selbst. In calciumfreier Badlösung zeigte sich ebenfalls eine prompte Zunahme der Stromdichte nach Beginn der Applikation von Hyperforin, jedoch fehlte die Einwärtsstrom-Komponente fast vollständig. Das Umkehrpotential verschob sich in negativere Bereiche. Damit stellte sich der durch die Hyperforin-Applikation ausgelöste Strom, im Gegensatz zur geringen Calciumselektivität von TRPC6-Homomeren (Boulay et al., 1997; Hofmann et al., 1999; Estacion et al., 2006), zumindest in seiner Einwärtsstrom-Komponente unter den gewählten Bedingungen als hochgradig Calcium-abhängig, wenn nicht sogar als calciumselektiv dar. Die Stromzunahme konnte überraschend in gleicher Weise auch bei untransfizierten HEK 293-Zellen in 2 mM Calcium enthaltener bzw. calciumfreier Badlösung nachgewiesen werden, fiel hier jedoch nur halb so groß aus. Eine Erklärungsmöglichkeit ist eine zusätzliche, geringere Stimulation von (endogen exprimierten) TRPC3-Kanälen, wie sie in der Publikation von Leuner et al. zu sehen ist (Leuner et al., 2007). Dagegen spricht, dass in den Calcium-Imaging-Versuchen an untransfizierten HEK 293-Zellen keine im Vergleich zu mit TRPC6 transfizierten HEK 293-Zellen halb so große Reaktion auf die Applikation von OAG zu sehen war.

Eine spezifische Aktivierung von TRPC6, zumindest von TRPC6-Homomeren, ist an sich in Frage zu stellen, da sowohl der von Leuner et al. unter Hyperforin-Applikation gemessene Strom, als auch der in weiterführenden Untersuchungen beispielsweise an kortikalen Neuronen von Maus-Embryonen (Tu et al., 2009) jeweils nicht die typischen Charakteristiken (homomerer) TRPC6-Kanäle zeigt. Prinzipiell ist eine Heteromultimerisation von TRPC6 mit anderen Kanälen durch Hyperforin denkbar. Dies erklärt jedoch nicht, weshalb in weiterführenden Untersuchungen unseres



Instituts vollkommen gleich aussehende Ströme bei Messungen an TRPC6 stabil überexprimierenden und untransfizierten HEK 293-Zellen, wie auch an chromaffinen Nebennierenzellen, Mikrogliazellen und Astrozyten von TRPC6-defizienten Mäusen, sowie selbst an Lipid-Bilayer-Membranen gesehen werden konnten (Sell et al., 2014). Vielmehr zeigten sich bei Messungen mit Hyperforin protonophore Eigenschaften (Roz und Rehavi, 2003; Tu et al., 2010; Bouron und Lorrain, 2014; Sell et al., 2014). So konnte gezeigt werden, dass Hyperforin, ähnlich dem Stoff Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon (FCCP), einem Hemmer der oxidativen Phosphorylierung, den pH-Gradient über synaptischen Vesikelmembranen (Roz und Rehavi, 2003), sowie das Membranpotential von aus kortikalen Neuronen isolierten Mitochondrien aufhob. Zudem kam es unter Hyperforinapplikation zu einer Freisetzung von Calcium und Zink aus Mitochondrien, vermutlich über Calcium-Uniporter (Tu et al., 2010) und zu einer Veränderung der Fluidität der Zellmembran (Bouron und Lorrain, 2014). Sell et al. sahen in ihren Untersuchungen *direkte* protonophore Effekte von Hyperforin ähnlich der von FCCP, unabhängig von einer Expression von TRPC6 oder jeglichen sonstigen Kanalproteinen, selbst an Lipid-Bilayer-Membranen. Die von ihnen gemessenen Ströme zeigten sich unabhängig von Natrium-, Kalium-, Chlorid-, Magnesium- und Calciumionen und waren einzig abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration (pH) der verwendeten Lösungen (Sell et al., 2014). Weshalb die Stromantworten stabil TRPC6 überexprimierender Zellen in den vorliegenden Untersuchungen größer ausfiel als bei untransfizierten HEK 293-Zellen, ist somit weiter unklar. In Strukturvergleichen von Hyperforin und anderen Phloroglucinolen konnte gezeigt werden, dass zwei symmetrische Acylgruppen, ähnlich der Struktur von DAG, für eine Bindung an TRPC6 und eine Aktivierung des unter Hyperforin-Applikation messbaren Stromes notwendig sein sollen (Leuner et al., 2010). Denkbar ist, dass Hyperforin seine protonophoren Eigenschaften unabhängig von TRPC6 entfaltet, dass jedoch durch die o.g. Strukturähnlichkeit zu DAG eine Bindung von Hyperforin an TRPC6 erfolgt und dadurch eine stabilere Integration von Hyperforin in Zellmembranen ermöglicht wird, als dies ohne TRPC6 möglich wäre. Somit könnte der protonophore Effekt durch Hyperforin mit einer eventuell sekundären Beeinflussung u.a. des Calciumspiegels in TRPC6 überexprimierenden Zellen deutlicher ausfallen. Sell et al. konnten jedoch im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen keine Unterschiede in den Stromantworten von TRPC6 stabil überexprimierenden und untransfizierten HEK 293-Zellen sehen (Sell et al., 2014).

In calciumfreier Badlösung zeigte sich ein massiv verminderter Einwärtsstrom bei nahezu unveränderter Auswärtsstrom-Komponente. Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Sell et al., welche keine Unterschiede zwischen Messungen in Calcium-haltiger und Calcium-freier Badlösung ergaben (Sell et al., 2014). Im Unterschied zu den hier vorliegenden Untersuchungen, bei denen EGTA als Calcium-Chelator in der intrazellulären (Pipetten-) Lösung verwendet wurde, wurde

in den Experimenten von Sell et al. BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) verwendet. Möglicherweise kann dies die unterschiedlichen Stromantworten erklären, da BAPTA selbst Einfluss auf Kanalproteine nimmt (Bödding und Penner, 1999) und EGTA pH-sensibel ist (Martell und Smith, 1974). Da eine spezifische und alleinige Aktivierung von TRPC6 durch Hyperforin nicht nachweisbar war, erfolgten keine weiteren Messungen mit Hyperforin.

### **5.2.3 Chromaffine Nebennierenzellen von Mäusen**

Wider Erwarten konnte durch die Applikation von OAG keine zusätzliche Stromantwort in chromaffinen Nebennierenzellen ausgelöst werden, weder unter Standardbedingungen (-80 mV Haltepotential, 2 mM Calcium enthaltende Badlösung), noch unter modifizierten Messbedingungen (0 mV Haltepotential zum Ausschalten spannungsabhängiger Natrium- und Calcium-Ionenkanäle; 10 mM CsCl bzw. 200 mM Calcium enthaltende Badlösung zum Ausschalten von Kalium-Ionenkanälen bzw. Augmentierung von TRPC6-Strömen). Auch unter Carbachol-Applikation konnte keine TRPC6-typische Stromantwort gemessen werden. Weder durch OAG, noch durch Carbachol kam es zu einer Änderung des spannungsaktivierten Natrium- und Calciumeinstromes. Weshalb keine zusätzlichen Ströme bei OAG- und keine TRPC3/-6/-7-typischen Ströme bei Carbacholapplikation detektierbar waren, obwohl TRPC6 mittels RT-PCR und Western Blot in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen nachweisbar war, OAG in Calcium-Imaging-Experimenten zu einem Calcium-Einstrom in chromaffine Nebennierenzellen von Mäusen führte und unter den genannten Bedingungen in TRPC6 stabil überexprimierenden HEK 293-Zellen mittels OAG- und Carbachol-Applikation ein für TRPC6 typischer Strom aktiviert werden konnte, ist unklar, zumal in einer nach Ende der Experimente veröffentlichten Untersuchung an chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen ebenfalls TRPC6 (wie auch alle anderen TRPC-Kanäle) nachgewiesen werden konnte (Wu, Fann und Kao, 2010). Es sind mehrere Erklärungen denkbar:

- 1.) Eine Einbindung von TRPC3/6/7 in ein Aktivierungssystem, bei welchem eine Aktivierung von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren mit Bildung von DAG zur Generierung eines Kationeneinstromes durch Öffnung o.g. Kanäle führt. Dies führt zu einer Depolarisation der Zelle und dadurch zu einer Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle, was wiederum einen Calciumeinstrom über die Zellmembran und ggf. eine calciuminduzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern zur Folge hat (s. Soboloff et al., 2005; Estacion et al., 2006). In der Folge kommt es zu einer konsekutiven Inaktivierung der OAG-sensitiven Kanäle im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus. Eine Interaktion von TRPC-Kanälen mit spannungsabhängigen Calciumkanälen wurde postuliert (Soboloff et

al., 2005); in embryonalen Herzzellen konnte eine Koimmunopräzipitation, wie auch synergistische Effekte beider Kanalgruppen gemessen werden (Sabourin et al., 2011). Für die o.g. Patch-Clamp-Untersuchungen bedeutete dies, dass TRPC3/-6/-7 bereits auf Grund der repetitiven Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle im Rahmen der applizierten Spannungsrampen inaktiviert ist. Die fehlende Demaskierung eines für OAG-sensitive Kanäle typischen Stromes bei den Messungen mit 0 mV Haltepotential könnte dadurch bedingt sein, dass eine Reaktivierung der OAG-sensitiven Kanäle erst nach Übergang der spannungsabhängigen Kanäle in den Zustand „geschlossen, aktivierbar“ möglich ist, was jedoch erst bei Repolarisation geschieht.

- 2.) Ebenfalls denkbar ist eine Inaktivierung durch in der Zelle kumulierte Calcium-Calmodulin-Komplexe auf Grund der repetitiven Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle mit konsekutivem Calciumeinstrom und Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Reticulum (CIRPIB; s. Abb. 2.3). Für hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen wurde ein entsprechender Effekt von Calcium/Calmodulin auf TRPC6 beschrieben (Boulay, 2002; Shi et al., 2004). Bei einem auf 100 nM gepufferten Calciumgehalt der Pipettenlösung sollte dies nicht auftreten, es sei denn im Rahmen lokal stark erhöhter Calciumkonzentrationen in Microdomains nahe der Rezeptoren.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass durch die repetitiven Spannungsrampen eine kontinuierliche Katecholaminsekretion ausgelöst wurde und dass co-sezernierte Stoffe ggf. ebenfalls hemmende/modulierende Wirkungen auf TRP-Kanäle entfalten können (s.2.2.6). Zudem ist zu beachten, dass die in Überexpressionssystemen von TRPC6-Homomeren gewonnenen Messergebnisse nicht eins zu eins auf die Situation *in vivo* übertragbar sind, da TRPC6 *in vivo* Heteromultimere ausbilden kann, von denen zu erwarten ist, dass sie spezifische, sich von den aus Messungen an TRPC6-Homomeren gewonnenen Ergebnissen unterscheidende Reaktionen zeigen (Strubing et al., 2003, Storch et al., 2012; Dietrich und Gudermann, 2014). Da es durch o.g. Versuche nicht möglich war, für TRPC6 (oder die verwandten Ionenkanäle TRPC3/-7) typische Ströme zu messen, wurde auf weitere Messungen an chromaffinen Nebennierenzellen von TRPC6-defizienten Mäusen („Negativ-Kontrollen“) und Messungen in calciumfreier Badlösung verzichtet.

Unter Carbachol-Applikation war nach wenigen Sekunden ein kleiner, transienter Einwärtsstrom in die Zellen messbar. Dieser nahm bei sinkendem Membranpotential annähernd linear zu. Das Umkehrpotential lag bei ca. -10 mV. Oberhalb dieses Wertes war kein Strom messbar. Der Strom war mit allen Messprotokollen darstellbar, nahm rasch an Stärke ab und verschwand vollständig mit Ende der Applikation. Durch welche Kanäle dieser Strom repräsentiert wird, konnte nicht abschließend

geklärt werden; am wahrscheinlichsten repräsentiert er einen durch nikotinische Acetylcholinrezeptoren vermittelten Strom. Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren zeigen ein streng einwärts gleichrichtendes Verhalten mit annähernd linearer Zunahme des Stromes mit sinkendem Membranpotential (Hirano et al., 1987; Haghighi und Cooper, 1998). Das Umkehrpotential liegt teilweise nahe 0 mV, teilweise etwas negativer, je nach Zusammensetzung des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (Bertrand et al., 1990; Haghighi und Cooper, 1998). Für chromaffine Nebennierenzellen von Ratten wurde ein Umkehrpotential von -7,2 mV gemessen (Hirano et al., 1987). Oberhalb des Umkehrpotentials ist kaum ein Strom zu messen. Es wird angenommen, dass dieser Effekt durch intrazelluläre Polyamine wie Spermin vermittelt wird (Haghighi und Cooper, 1998). Auffällig ist jedoch, dass die in den vorliegenden Experimenten detektierten Ströme relativ klein sind. Dies steht scheinbar im Gegensatz zu der Beobachtung, dass der Carbachol-vermittelte Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in Calcium-freier Badlösung fast komplett fehlt. Eine Erklärung wäre, dass dieser nur teilweise durch einen Calcium-Einstrom über die Zellmembran vermittelt wird, welcher in einem weiteren Schritt eine Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung bewirkt. Tatsächlich konnten Wu, Fann und Kao eine Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen nachweisen, ebenso eine Expression aller drei Ryanodinrezeptor-Subtypen. Weiterführende Untersuchungen zeigten funktionierende Ryanodinrezeptoren in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen (Wu, Fann und Kao, 2010).

Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle scheiden aus, da der Strom auch bei den Messungen in 10 CsCl enthaltender Badlösung sichtbar war. Ebenfalls messbar war der Strom bei den Messungen mit 0 mV Haltepotential. Bei den Messungen in nur 200  $\mu$ M Calcium enthaltender Badlösung war der Strom ebenfalls detektierbar.

Alternativ wäre ein Speicher-gesteuerter Calcium-Einstrom denkbar. Dafür spricht die  $I_{CRAC}$  ähnelnde Strom-Spannungs-Kennlinie, sowie das Auftreten nur unter Stimulation der chromaffinen Nebennierenzellen mit Carbachol, welches zusätzlich zum Calciumeinstrom über die Zellmembran  $IP_3$ -vermittelt eine Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Reticulum bewirkt. Gegen einen typischen, STIM- und Orai-vermittelten CRAC-Strom (Park et al., 2009) spricht das Auftreten des Stromes auch bei nur 200  $\mu$ M Calcium enthaltender Badlösung. Jedoch ist denkbar, dass der o.g. Strom durch Heteromultimere aus ORAI und TRPC-Kanälen (Jardin et al., 2009; Liao et al., 2009; Berna-Erreo et al., 2012; Dionisio et al., 2012) oder direkte Interaktion zwischen STIM und beispielsweise TRPC4-TRPC6-Heteromultimeren vermittelt wird (Yuan et al., 2007; Cahalan 2009; Dietrich und Gudermann, 2014), welche ggf. andere Verhaltensmuster zeigen, als dies für klassische CRAC-Ströme bekannt ist. Dazu könnte auch eine Verstärkung der Stromantwort bei niedrigen extrazellulären Calciumkonzentrationen gehören, wie dies für TRPC6 bekannt ist (Jung et al., 2001;

Shi et al., 2004). Dabei ist denkbar, dass eine Rekrutierung von TRPC6-Kanälen zusammen mit ORAI in Lipidrafts durch STIM stattfindet, mit einer konsekutiven Formung speicheraktivierter Kanäle (Liao et al., 2009), ggf. nach Loslösung u.a. von spannungsabhängigen Calciumkanälen und konsekutiver Deblockierung (s. auch Jardin et al., 2009).

## 5.3 Ausblick

Für TRP-Kanäle wurde in den letzten Jahren die Beteiligung an einer Vielzahl unterschiedlichster, den ganzen Körper betreffender physiologischer und pathophysiologischer Regulationsmechanismen nachgewiesen. Dabei agieren sie teilweise als rezeptorgesteuerte, teilweise als speichergesteuerte Kanäle. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Transkription und Expression von TRPC6 in chromaffinen Nebennierenzellen von Mäusen nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Calciumionen-Konzentrationserhöhung in diesen Zellen fast ausschließlich abhängig ist von einem Calciumeinstrom über die Zellmembran und dass OAG-sensitive Kanäle an der Calciumsignalgebung dieser Zellen beteiligt sind. Eine Zuordnung, welche TRPC-Ionenkanäle an dieser Calcium-Antwort beteiligt sind, konnte mangels spezifischer Aktivatoren und Inhibitoren nicht erfolgen, insbesondere, nachdem sich eine spezifische Aktivierung von TRPC6 durch Hyperforin als fragwürdig herausstellte. Das Fehlen spezifischer Stromantworten unter den o.g. Messbedingungen lässt eine Inaktivierung durch eine funktionelle Kopplung an spannungsabhängige Calciumkanäle annehmen, ggf. auch eine Hemmung durch hohe Calcium/Calmodulin-Werte in funktionellen Mikrodomains (s. 5.2.3). Ein genaueres Verständnis der zu Grunde liegenden Prozesse kann durch Versuche mit Blockern spannungsabhängiger Calciumkanäle erlangt werden. Auch Messungen bei deutlich negativen Membranpotentialen zur Verhinderung der Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle und einer angenommenen konsekutiven Inaktivierung der OAG-sensitiven Kanäle, sowie Current Clamp-Messungen können zielführend sein. Eine mögliche Hemmung durch Calcium/Calmodulin kann mittels Calmidazolium (Calmodulin-Hemmstoff); KN 62 (Calmodulin-abhängige Kinase II-Inhibitor) oder Ersetzen von ATP durch AMP-PNP (nicht hydrolysierbares ATP) in der die Patch-Pipette füllenden „intrazellulären Lösung“ (Shi et al., 2004) untersucht werden. Mittels Co-Immunopräzipitations-Untersuchungen könnte eine Beteiligung am speichergesteuerten Calciumeinstrom, wie o.g. untersucht werden. Hyperforin bedarf weiterer Untersuchungen zur Beleuchtung seiner genauen Wirkweise. Eine alleinige und typische Aktivierung von TRPC6 ist in Frage zu stellen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abramowitz J, Birnbaumer L (2009) Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *The FASEB Journal* 2009 Feb. Vol. 23:297-328
- Adkins CE, Taylor CW (1999) Lateral inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cytosolic Ca(2+). *Curr Biol.* 1999 Oct 7;9(19):1115-8
- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M, Peters JA, Harmar AJ, CGTP Collaborators. (2013) The Concise Guide to Pharmacology 2013/14: Ligand-Gated Ion Channels. *Br J Pharmacol.* 2013 170: 1582–1606
- Alfonso S, Benito O, Alicia S, Angélica Z, Patricia G, Diana K, Vaca L (2008) Regulation of the cellular localization and function of human transient receptor potential channel 1 by other members of the TRPC family. *Cell Calcium.* 2008 Apr;43(4):375-87
- Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, García AG, García-Sancho J, Montero M, Alvarez J (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> Release in Chromaffin Cells Seen from inside the ER with Targeted Aequorin. *J Cell Biol.* 1999 Jan 25; 144(2): 241–254
- Atwood BK, Lopez J, Wager-Miller J, Mackie K, Straiker A (2011) Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics* 2011 12:14
- Bae YM, Kim A, Lee YJ, Lim W, Noh YH, Kim EJ, Kim J, Kim TK, Park SW, Kim B, Cho SI, Kim DK, Ho WK (2007) Enhancement of receptor-operated cation current and TRPC6 expression in arterial smooth muscle cells of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats *Journal of Hypertension* 2007 25:809–817
- Baltimore D (1970) Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses *Nature* 1970 226:1209-1211
- Basora N, Boulay G, Bilodeau L, Rousseau E, Payet MD (2003) 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem* 2003 278:31709-31716

- Benfenati F, Valtorta F, Rubenstein JL, Gorelick FS, Greengard P, Czernik AJ (1992) Synaptic vesicle-associated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is a binding protein for synapsin I. *Nature* 1992 Oct 1; 359(6394):417-20
- Berna-Erreo A, Galan C, Dionisio N, Gomez LJ, Salido GM, Rosado JA (2012) Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets. *Biochem Biophys Acta*. 2012 Aug;1823(8):1242-51
- Berridge MJ, Lipp P, Bootmann MD (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000 Oct; 1(1):11-21
- Bödding M, Penner R. (1999) Different modulation of voltage dependent Ca<sup>2+</sup> currents by EGTA and BAPTA in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch* 1999; 439:27–38.
- Bödding, M (2001) Histamine-induced Ca<sup>2+</sup> release in bovine adrenal chromaffin cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2001 Dec;364(6):508-15
- Bonaventure P, Guo H, Tian G, Liu X, Bittner A, Roland B, Salunga R, Ma XJ, Kamme F, Meurers B, Bakker M, Jurzak M, Leysen JE, Erlander MG (2002) Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Res* 2002 943:38-47
- Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Cloning and Expression of a novel mammalian homolog of a Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* 1997 272:29672-29680
- Boulay G (2002) Calcium-Calmodulin regulates receptor-operated calcium entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells. *Cell Calcium* 2002 Oct;32(4):201-7
- Bouron A, Lorrain E (2014) Cellular and molecular effects of the antidepressant hyperforin on brain cells: Review of the literature. *Encephale*. 2014 Apr;40(2):108-13
- Bousquet SM, Monet M, Boulay G (2010) Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. *J Biol Chem*. 2010 Dec 24;285(52):40534-43

Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981 Apr;112(2):195-203

Cahalan MD (2009) STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nat Cell Biol.* 2009 Jun;11(6):669-77

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2014) Voltage-gated calcium channels, introduction. Last modified on 06/03/2014. Accessed on 09/04/2014. *IUPHAR database*

Chaudhuri P, Colles SM, Bhat M, Van Wagoner DR, Birnbaumer L, Graham LM (2008) Elucidation of a TRPC6–TRPC5 channel cascade that restricts endothelial cell movement *Molecular Biology of the Cell*, 2008 (19):3203-3211

Chu X, Tong Q, Cheung JY, Wozney J, Conrad K, Mazack V, Zhang W, Stahl R, Barber DL, Miller BA (2004) Interaction of TRPC2 and TRPC6 in erythropoietin modulation of calcium influx. *J Biol Chem.* 2004 Mar 12;279(11):10514-22

Clapham DE, Julius D, Montell C, Schulz G (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 2005 57:427-450

Cole KS, Curtis HJ (1940) Membrane potential of the squid giant axon during current flow. *The Journal of General Physiology* 1940 Nov 1;551-563

Cole KS (1979) Mostly Membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 1979 41:1-24.

Corteling RL, Li S, Giddings J, Westwick J, Poll C, Hall IP (2004) Expression of transient receptor potential channel C6 and related transient receptor potential family members in human airway smooth muscle and lung tissue. *Am J Respir Mol Cell Biol* 2004 30:145-154

Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 1969 224:285-287



- Damann N, Owsianik G, Li S, Poll C, Nilius B (2009) The calcium-conducting ion channel transient receptor potential canonical 6 is involved in macrophage inflammatory protein-2-induced migration of mouse neutrophils *Acta Physiologica* (Oxford), 2009 195:3-11
- Davis J, Burr AR, Davis GF, Birnbaumer L, Molkentin JD (2012) A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Dev Cell*. 2012 Oct 16;23(4):705-15
- D'Esposito M, Strazzullo M, Cuccurese M, Spalluto C, Rocchi M, D'Urso M, Ciccodicola A (1998) Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21->q22. *Cytogenet Cell Genet* 1998 83:46-47
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Argüelles H, Borges R (2008) Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008 Feb;192(2):145-63
- Dietrich A, Mederos YSM, Emmel J, Kalwa H, Hoffman T, Gudermann T (2003) N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *Journal of Biological Chemistry* 2003 278:47842-4785
- Dietrich A, Mederos YSM, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaya G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L (2005) Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice *Molecular and Cellular Biology*, 2005 25:6980–6989
- Dietrich A and Gudermann T, (2014) TRPC6: Physiological Function and Pathophysiological Relevance. *Handb Exp Pharmacol*. 2014 222:157-88
- Dionisio N, Albarran L, Bernal-Enrique A, Hernandez-Cruz JM, Salido GM, Rosado JA (2011) Functional role of the calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding (CIRB) site of TRPC6 in human platelet activation. *Cell Signal*. 2011 Nov;23(11):1850-6
- Duman JG, Chen L, Hille B (2008) Calcium Transport Mechanisms of PC12 Cells. *J Gen Physiol*. 2008 Apr;131(4):307-23

- Estacion M, Sinkins WG, Gosling M, Bahra P, Poll C, Westwick J, Schilling WP (2004) Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. *J Biol Chem* 2004 279:22047-22056
- Estacion M, Sinkins WG, Jones SW, Applegate MA, Schilling WP (2006) TRPC6 forms non-selective cation channels with limited calcium permeability. *J Physiol*. 2006 572: 359-377
- Falkner B, Jonas P. (2010) Grundlagen zellulärer Erregbarkeit. In: Schmidt RF, Thews G (eds) Physiologie des Menschen, Springer 31. Auflage 2010, S. 58
- Fenwick EM, Marty A, Neher E. (1982) A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol* 1982 331: 577–597
- Foller M, Kasinathan RS, Koka S, Lang C, Shumilina E, Birnbaumer L, Lang F, Huber SM (2008) TRPC6 contributes to the  $\text{Ca}^{2+}$  leak of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2008;21(1-3):183-92
- Garcia RL, Schilling WP (1997) Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Oct 9;239(1):279-83
- García AG, García-De-Diego AM, Gandía L, Borges R, García-Sancho J (2006) Calcium Signaling and Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells. *Physiological Reviews* 2006 86:1093-1131
- Gay LA., Stanfield PR (1977)  $\text{Cs}^{+}$  causes a voltage-dependent block of inward K currents in resting skeletal muscle fibers. *Nature* 1977 267:169-170
- Gees M, Colasoul B, Nilius B. (2010) The role of transient receptor potential channels in calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010 2:a003962
- Gibon J, Tu P, Bohic S, Richaud P, Arnaud J, Zhu M, Boulay G, Bouron A (2011) The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Dec;1808(12):2807-18
- Goel M, Sinkins WG, Schilling WP (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 2002 277:48303-48310

- Graham S, Ding M, Sours-Brothers, S, Yorio T, Ma JX, Ma R (2007) Downregulation of TRPC6 protein expression by high glucose, a possible mechanism for impaired calcium signalling in glomerular mesangial cells in diabetes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007 293, F1381-F1390
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985 Mar 25; 260(6):3440-50
- Gulbins E, Lang F. (2010) Signaltransduktion. In: Schmidt RF, Thews G (eds) Physiologie des Menschen, *Springer* 31. Auflage 2010, S. 30
- Haghighi AP, Cooper E (1998) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors are blocked by intracellular spermine in a voltage-dependent manner. *J Neurosci.* 1998 Jun 1;18(11):4050-62
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981 Aug; 391(2):85-100
- Hassock SR, Zhu MX, Trost C, Flockerzi V, Authi KS (2002) Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood.* 2002 Oct 15;100(8):2801-11
- Heinrich PH, Müller M, Graeve L (eds) Löffler Petrides Biochemie und Pathobiochemie. *Springer*, 9. Auflage, 2014, p. 361
- Hille B (1992) Pumping ions. *Science* 1992 Feb 7;255(5054): 742
- Hirano T, Kidokoro Y, Ohmori H (1987) Acetylcholine dose-response relation and the effect of cesium ions in the rat adrenal chromaffin cell under voltage clamp. *Pflugers Arch.* 1987 Apr;408(4):401-7
- Hirokawa N, Sobue K, Kanda K, Harada A, Yorifuji H (1989) The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin I. *J Cell Biol* 1989 108:111-126
- Hisatsune C, Kuroda Y, Nakamura K, Inoue T, Nakamura T, Michikawa T, Mizutani A, Mikoshiba K (2004) Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 2004 Apr 30; 279(18):18887-94

- Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T, Mikoshiba K (2005) Amplification of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem*. 2005 Mar 25;280(12):11723-30
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999) direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 1999 397:259-263
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 99:7461-7466
- Huppelsberg J, Walter K (2005) Kurzlehrbuch Physiologie. *Georg Thieme Verlag*, 2. Auflage, 2005
- Hu G, Oboukhova EA, Kumar S, Sturek M, Obukhov AG (2009) Canonical transient receptor potential channels expression is elevated in a porcine model of metabolic syndrome. *Mol Endocrinol*. 2009 May;23(5):689-99
- Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular  $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated calcium-permeable cation channel. *Circ Res* 2001 88:325-332
- Jardin I, Gómez LJ, Salido GM, Rosado JA (2009) Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways. *Biochem J*. 2009 May 13;420(2):267-76
- Jung S, Strotmann R, Schulz G, Plant TD (2002) TRPC6 is a candidate channel involved in receptor stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 282:C347-359
- Kao LS, Schneider AS (1985) Muscarinic receptors on bovine chromaffin cells mediate a rise in cytosolic calcium that is independent of extracellular calcium. *J Biol Chem*. 1985 Feb 25;260(4):2019-22
- Kim JY, Saffen D (2005) Activation of M1 Muscarinic Acetylcholine Receptors Stimulates the Formation of a Multiprotein Complex Centered on TRPC6 Channels. *J Biol Chem*. 2005 Sep 9;280(36):32035-47

- Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, Olson EN (2006) TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling *Journal of Clinical Investigation*, 2006 116:3114–3126
- Kwan HY, Huang Y, Yao X (2004) Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 101:2625-30
- Kwon Y, Hofmann T, Montell C (2007) Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol Cell*. 2007 Feb 23;25(4):491-503
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5
- Leuner K, Kazanski V, Müller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, Harteneck C, Müller WE (2007) Hyperforin - a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *The FASEB Journal* 2007 21:14 4101-4111
- Leuner K, Heiser JH, Derksen S, Mladenov MI, Fehske CJ, Schubert R, Gollasch M, Schneider G, Harteneck C, Chatterjee SS, Müller WE (2010) Simple 2,4-Diacetylphloroglucinols as Classic Transient Receptor Potential-6 Activators – Identification of a Novel Pharmacophore. *Mol Pharmacol* 2010 77:368-377
- Leuner K, Kraus M, Woelfle U, Beschmann H, Harteneck C, Boehnke WH, Schempp CM, Müller WE (2011) Reduced TRPC Channel expression in psoriatic keratinocytes is associated with impaired differentiation and enhanced proliferation. *PLoS ONE* 2011 6(2): e14716
- Liao Y, Plummer NW, George MD, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L (2009) A role for Orai in TRPC-mediated Ca<sup>2+</sup> entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):3202-6
- Lin Y, Zhang JC, Fu J, Chen F, Wu ZL, Yuan SY (2013) Hyperforin attenuates brain damage induced by transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats via inhibition of TRPC6 channels degradation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013 Feb;33(2):253-62

Liu X, Bandyopadhyay BC, Singh BB, Groschner K, Ambudkar IS (2005) Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *J Biol Chem.* 2005 Jun 3;280(22):21600-6

Liu D., Maier A, Scholze A, Rauch U, Boltzen U, Zhao Z, Zhu Z, Tepel M (2008) High glucose enhances transient receptor potential channel canonical type 6-dependent calcium-influx in human platelets via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008 28:746-751

Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron.* 2003 Oct 30;40(3):551-61

Lussier MP, Cayouette S, Lepage PK, Bernier CL, Francoeur N, St-Hilaire M, Pinard M, Boulay G (2005) MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. *J Biol Chem.* 2005 May 13;280(19):19393-400

Maier T, Follmann M, Hessler G, Kleemann HW, Hachtel S, Fuchs B, Weissmann N, Linz W, Schmidt T, Löhn M, Schroeter K, Wang L, Rütten H, Strübing C (2015) Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels. *Br J Pharmacol.* 2015 Jul;172(14):3650-60

Martell AE, Smith RM (eds.; 1974) Critical stability constants, Vol. 1. *Plenum Press*, 1974

Menderos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M, Gudermann T (2008) Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J.* 2008 Dec 3;27(23):3092-103

Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS, Putney JW Jr. (2006) Large store-operated calcium-selective currents due to co-expression of ORAI1 or ORAI2 with the intracellular calcium sensor, STIM1. *J Biol Chem.* 2006 Aug 25;281(34):24979-90

Miehe S, Crause P, Schmidt T, Löhn M, Kleemann HW, Licher T, Dittrich W, Rütten H, Strübing C (2012) Inhibition of diacylglycerol-sensitive TRPC channels by synthetic and natural steroids. *PLoS One.* 2012;7(4):e35393

- Montell C, Rubin TM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989 2:1313-1323
- Müller M, Essi K, Hill K, Rubant S, Schempp CM, Gollasch M, Boehnke WH, Harteneck C, Müller WE, Leuner K (2008) Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation. *J Biol. Chem.* 2008 Dec 5; 283(49):33942-54
- Mwanjewe J, Grover AK (2004) Role of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) in non-transferrin-bound iron uptake in neuronal phenotype PC12 cells. *Biochem J.* 2004 Mar 15;378(3):975-82
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976 Apr 29; 260(5554):799-802
- Neher E, Sakmann B (1992) The patch clamp technique. *Sci Am.* 1992 Mar;266(3):44-51
- Nelson PL, Beck A, Cheng H (2010) Transient receptor proteins illuminated: current views on TRPs and disease. *Vet J.* 2011 Feb. 187(2):153-64
- Netter FH (1995) Atlas der Anatomie des Menschen. *Ciba-Geigy*, 2. Auflage, 1995
- Nilius B, Owsianik G (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology* 2011 12:218
- Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H (2007) Galpha12/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation. *J. Biol. Chem.* 2007 282:23117-23128
- Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Die T, Inoue R, Kurose H (2010) Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J Biol Chem.* 2010 Apr 23;285(17):13244-53
- Obukhov AG, Nowycky MC (2005) A cytosolic residue mediates Mg<sup>2+</sup> block and regulates inward current amplitude of a transient receptor potential channel. *J Neurosci.* 2005 Feb 2;25(5):1234-9

Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K, Mori Y (1999) Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Calcium permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 274:27359-70

Onohara N, Nishida M, Inoue R, Kobayashi H, Sumimoto H, Sato Y, Mory Y, Nagao T, Kurose H (2006) TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 2006 Nov 15;25(22):5305-16

Otsuka Y, Sakagami H, Owada Y, Kondo H (1998) Differential localization of mRNAs for mammalian trps, presumptive capacitative calcium entry channels, in the adult mouse brain. *Tohoku J Exp Med* 1998 185:139-146

Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, Walz T, Garcia KC, Dolmetsch RE, Lewis RS (2009) STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1 *Cell* 2009 136 (5): 876–90

Rafael J, Patzelt J (1987) Binding of diltiazem and verapamil to isolated rat heart mitochondria. *Basic Res Cardiol*. 1987 May-Jun;82(3):246-51

Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP Channels. *Annu. Rev. Physiol.* (2006) 68:619-47

Redondo PC, Jardin I, Lopez JJ, Salido GM, Rosado JA (2008) Intracellular Ca<sup>2+</sup> store depletion induces the formation of macromolecular complexes involving hTRPC1, hTRPC6, the type II IP<sub>3</sub> receptor and SERCA3 in human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jun;1783(6):1163-76

Reiser J, Polu KR, Moller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function *Nature Genetics*, 2005 37:739–744

Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Jul;76(7):3116-20



- Roz N, Rehavi M (2003) Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. *Life Sci.* 2003 Jun 13;73(4):461-70
- Sabourin J, Robin E, Raddatz E (2011) A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart. *Cardiovasc Res.* 2011 Nov 1;92(2):226-36
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 Dec 20; 230(4732):1350-4
- Sakmann B, Neher E. (1984) Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 1984 46:455-72
- Saleh SN, Albert AP, Large WA (2009) Activation of native TRPC1/C5/C6 channels by endothelin-1 is mediated by both PIP3 and PIP2 in rabbit coronary artery myocytes. *J Physiol.* 2009 Nov 15;587(22):5361-75
- Schaefer M (2005) Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 2005 451:35–42
- Schilling T, Eder C (2009) Non-selective cation channel activity is required for lysophosphatidylcholine-induced monocyte migration *Journal of Cellular Physiology* 2009 221:325-334
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature.* 2000 Mar 9;404(6774):197-201
- Sel S, Rost BR, Yildirim AO, Sel B, Kalwa H, Fehrenbach H, Renz H, Gudermann T, Dietrich A (2008) Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response. *Clinical and Experimental Allergy* 2008 38:1548–1558
- Sell TS, Belkacemi T, Flockerzi V, Beck A (2014) Protonophore properties of hyperforin are essential for its pharmacological activity. *Sci Rep.* 2014 Dec 16;4:7500

- Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* 2002 Jun;16(8):869-71. Zusätzliche Daten: <http://webserver.mbi.ufl.edu/~shaw/293.html>
- Shi J, Mori E, Mori Y, Li J, Ito Y, Inoue R (2004) Multiple regulation of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol* 2004 561.2:415-432
- Silbernagl S, Despopoulos A (2012) Taschenatlas Physiologie. *Thieme*, 8. Auflage, 2012
- Singh I, Knezevic N, Ahmmed GU, Kini V, Malik AB, Mehta D (2007) Galphag-TRPC6-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. *Journal of Biological Chemistry* 2007 282:7833–7843
- Soboloff J, Spassova M, Xu W, He LP, Cuesta N, Gill DL (2005) Role of endogenous TRPC6 channels in  $\text{Ca}^{2+}$  signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2005 Dec 2;280(48):39786-94
- Storch U, Forst AL, Philipp M, Gudermann T, Mederos y Schnitzler M (2012) Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *J Biol Chem.* 2012 Jan 27;287(5):3530-40
- Strubing C, Krapivinski G, Krapivinsky L, Clapham DE (2003) Formation of Novel TRPC Channels by Complex Subunit Interactions in Embryonic Brain. *J Biol Chem.* 2003 Oct 3;278(40):39014-9
- Südhoff TC, Rizo J (2011) Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011 Dec 1;3(12):a005637
- Suzuki F, Morishima S, Tanaka T, Muramatsu I (2007) Snapin, a New Regulator of Receptor Signaling, Augments 1A-Adrenoceptor-operated Calcium Influx through TRPC6. *J Biol Chem.* 2007 Oct 5;282(40):29563-73
- Tackmann W (1999) Auxilium-Repetitorium der Histologie. *Auxilium-Repetitorien*, unveränderter Nachdruck der 4. Auflage, 1991

- Tai Y, Feng S, Ge R, Du W, Zhang X, He Z, Wang Y (2008) TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV–CREB pathway. *Journal of Cell Science* 2008 121:2301–2307
- Takeshima H, Venturi E, Sitsapesan R (2015) New and notable ion-channels in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum: do they support the process of intracellular Ca(2+) release? *J Physiol.* 2015 Aug 1;593(15):3241-51
- Temin HM, Mizutani S (1970) Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature* 1970 226:1211-1213
- Thebault S, Flourakis M, Vanoverberghe K, Vandermoere F, Roudbaraki M, Lehen'kyi V, Slomianni C, Beck B., Mariot P, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Capiod T, Skryma R, Prevarskaya N (2006) Differential role of transient receptor potential channels in calcium entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res.* 2006 66:2038-2047
- Tseng PH, Lin HP, Hu H, Wang C, Zhu MX, Chen CS (2004) The canonical transient receptor potential 6 channel as a putative phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-sensitive calcium entry system. *Biochemistry.* 2004 Sep 21;43(37):11701-8
- Tsien RY (1981) A non-disruptive technique for loading calcium-buffers and indicators into cells. *Nature* 1981 Apr 9;290(5806): 527-8
- Tsvilovskyy W, Zholos AV, Aberle T, Philipp SE, Dietrich A, Zhu MX, Birnbaumer L, Freichel M, Flockerzi V (2009) Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology.* 2009 Oct;137(4):1415-24
- Tu P, Kunert-Keil C, Lucke S, Brinkmeier, Bouron A (2009) Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. *J. Neurochem.* 2009 108:126-138
- Tu P, Gibon J, Bouron A. (2010) The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria. *J. Neurochem.* 2010 Jan;112(1):204-13

Turner H, Fleig A, Stokes A, Kinet JP, Penner R (2003) Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity. *Biochem J.* 2003 Apr 15;371(2):341-50

Urban N, Wang L, Kwiek S, Rademann J, Kuebler WM, Schaefer M (2016) Identification and Validation of Larixyl Acetate as a Potent TRPC6 Inhibitor. *Mol Pharmacol.* 2016 Jan;89(1):197-213

Van Rossum DB, Oberdick D, Rbaibi Y, Bhardwaj G, Barrow RK, Nikolaidis N, Snyder SH, Kiselyov K, Patterson RL (2008) TRP\_2, a lipid/trafficking domain that mediates diacylglycerol-induced vesicle fusion. *J Biol Chem.* 2008 Dec 5;283(49):34384-92

Vazquez G, Wedel BJ, Kawasaki BT, Bird GS, Putney JW, Jr. (2004) Obligatory role of Src kinase in the signaling mechanism for TRPC3 cation channels. *J Biol Chem* 2004 279: 40521-40528

Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL (2003) Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* 2003 278:29031-40

Voets T, Nilius B (2007) Modulation of TRPs by PIPs. *J Physiol* 2007 582:939-944

Wagner S, Baars L, Ytterberg AJ, Klussmeier A, Wagner CS, Nord O, Nygren PA, van Wijk KJ, de Gier JW (2007) Consequences of membrane protein overexpression in Escherichia coli. *Mol Cell Proteomics.* 2007 Sep;6(9):1527-50

Waldeyer AJ (2003) Anatomie des Menschen. *Walter de Gruyter*, 17. Auflage, 2003

Washburn DG, Holt DA, Dodson J, McAtee JJ, Terrell LR, Barton L, Manns S, Waszkiewicz A, Pritchard C, Gillie DJ, Morrow DM, Davenport EA, Lozinskaya IM, Guss J, Basilla JB, Negron LK, Klein M, Willette RN, Fries RE, Jensen TC, Xu X, Schnackenberg CG, Marino JP Jr. (2013) The discovery of potent blockers of the canonical transient receptor channels, TRPC3 and TRPC6, based on an anilino-thiazole pharmacophore. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 Sep 1;23(17):4979-84

Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T (2006) Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 103:19093-19098

- Weißmann N, Sydykov A, Kalwa H, Storch U, Fuchs B, Menderos y Schnitzler M, Brandes RP, Grimminger F, Meissner M, Freichel M, Offermanns S, Veit F, Pak O, Krause KH, Schermuly RT, Brewer AC, Schmidt HH, Seeger W, Shah AM, Gudermann T, Ghofrani HA, Dietrich A (2012) Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion-induced oedema in mice. *Nat Commun.* 2012 Jan 31; 3:649
- Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE (2002) Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries *Circulation Research* 2002 90:248–250
- Wilkins BJ, Molkentin JD (2004) Calcium–calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004 322:1178–1191
- Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005 308:1801–1804
- Wisnoskey BJ, Sinkins WG, Schilling WP (2003) Activation of vanilloid receptor type I in the endoplasmic reticulum fails to activate store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Biochem J.* 2003 Jun 1;372(2):517-28
- Woo DH, Jung SJ, Zhu MH, Park CK, Kim YH, Oh SB, Lee CJ (2008) Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Mol Pain.* 2008 Oct 1;4:42
- Wu X, Babnigg G, Villereal ML (2000) Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca(2+) entry in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Mar;278(3):C526-36
- Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE (2010) International Union of Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacol. Rev.* 2010, 62:381-404
- Wu PC, Fann MJ, Kao LS (2010) Characterization of Ca<sup>2+</sup> signaling pathways in mouse adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 2010 112:1210-1222

Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX (2004) Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2004 101:13861–13866

Yu Y, Keller SH, Remillard CV, Safrina O, Nicholson A, Zhang SL, Jiang W, Vangala N, Landsberg JW, Wang JY, Thistlethwaite PA, Channick RN, Robbins IM, Loyd JE, Ghofrani HA, Grimminger F, Schermuly RT, Cahalan MD, Rubin LJ, Yuan JX (2009) A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2009 119:2313–2322

Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S (2007) STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):636-45

Zagranichnaya TK, Wu X, Villereal ML (2005) Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *J Biol Chem.* 2005 Aug 19;280(33):29559-69

Zhang L, Saffen D (2001) Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRPC6 calcium channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. *J Biol Chem* 2001 276:13331-13339

Zhang L, Guo F, Kim JY, Saffen D (2006) Muscarinic acetylcholine receptors activate TRPC6 channels in PC12D cells via Ca<sup>2+</sup> store-independent mechanisms. *J Biochem.* 2006 Mar;139(3):459-70

Zhou J, Du W, Zhou K, Tai Y, Yao H, Jia Y, Ding Y, Wang Y (2008) Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nature Neuroscience*, 2008 11:741–743

## **7 Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Bödding für das Überlassen des Themas der vorliegenden Dissertation und die hervorragende Betreuung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. V. Flockerzi danke ich für die Möglichkeit, wissenschaftlich zu arbeiten, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Pharmakologie der Universität des Saarlandes, sowie die Unterstützung und Diskussion der Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. A. Beck für die hervorragende Unterstützung, die hilfreichen Tipps, ausführliche Diskussion und Korrektur meiner Dissertation.

Ich danke Frau Heidi Löhr für die Hilfe bei der Zellkultur, Frau Ute Soltek und Frau Karin Wolske bei der DNA-Extraktion und Erstellung der Lösungen, Herrn Martin Simon-Thomas bei der technischen Unterstützung und allen anderen Mitarbeitern des Labors für ihre Unterstützung und hilfreichen Tipps.

Herrn A. Huwer danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Ich danke meiner Frau J. Huwer für die stetige Unterstützung während der gesamten Arbeit.